

**AVALIAÇÃO DE INSTABILIDADE DE
MICROSSATÉLITES E EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS HMLH1 E
HMSH2 EM PACIENTES COM SUSPEITA DE CÂNCER
COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE**

LIGIA PETROLINI DE OLIVEIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Benedito Mauro Rossi

Co-orientadores: Dra. Renata de Almeida Coudry

Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Ligia Petrolini de

Avaliação de instabilidade de microssatélites e expressão imunoistoquímica das proteínas hMLH1 e hMSH2 em pacientes com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose / Ligia Petrolini de Oliveira – São Paulo, 2008.

134p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Benedito Mauro Rossi

Descritores: 1. CÂNCER COLORRETAL. 2. CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE. 3. IMUNOHISTOQUÍMICA. 4. INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES. 5. REPARO DO DNA.

Não gosto quando vejo alguns rostos de angústia das pessoas que fazem tratamento de câncer no hospital, dia após dia... Por outro lado me sinto bem, pois estas pessoas tornam meus estudos um tanto nobre. Então me motiva em prosseguir e fico feliz, por tentar ajudar, de alguma forma, contra o que ninguém está completamente livre...

(Por muitas vezes, meus pensamentos)

Apenas aqueles que entendem os segredos do ciclo da vida e tornam firme a lição de "nada de novo" são imperadores despreocupados.

(Palavras do meu orientador)

E enfim, “tudo vale a pena, quando a alma não é pequena”.

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, para quem tudo é possível.

Agradeço ao meu marido Beto, simplesmente por existir em minha vida, por tudo que já vivemos e pela família que vamos construir.

Agradeço aos meus pais Lizete e Vitor, pelo amor, carinho, dedicação, educação, investimento e oportunidades. Sem eles estar aqui teria sido muito mais difícil. Saibam que todas as suas privações por mim serão recompensadas. Obrigada por me ajudarem a realizar meus sonhos.

Agradeço aos meus irmãos, Valéria e Ivan, por partilharem a minha infância e por me ajudar a amadurecer.

Agradeço as minhas adoráveis vovós, pela educação, pelo cuidado, pelos mimos, pelos doces. Com certeza vocês são os meus melhores exemplos de vida.

Agradeço aos meus tios e primos, pelas companhias de viagem e comemorações sempre tão divertidas. Muito de mim deve-se a esta convivência extremamente saudável e indispensável. Agradeço especialmente a minha Tia Luzia, pela dedicação em cuidar de mim quando criança.

Agradeço ao meu eterno cãozinho Godofredo, por ter feito de mim a criança mais feliz do mundo.

Agradeço as minhas melhores amigas, Tata e Raquel, pela amizade sincera, pela confiança, pela convivência.

Agradeço as minhas amigas de faculdade, Dri, Alê, Bru, Ju, Mari e Ro por me ajudarem a morar longe de casa e por tornarem os meus anos de faculdade muito alegres.

Agradeço a todos os meus amigos de pós-graduação e do Grupo de Pesquisa em Câncer Colorretal.

Agradeço aos amigos de laboratório, Alice, André, Cláudia, Edaise, Felipe, Fernanda, Gwen, Isabela, Juliana, Katia, Luciane, Luciene, Marcilei, Rodrigo, Yukie, por dividir comigo todos os meus dias de muito trabalho, problemas, almoços, risadas e principalmente, muito frio. Agradeço principalmente a minha amiga Mila, a

pessoa para quem “as coisas só acontecem com ela”, pela amizade, pelos almoços, pela bancada de trabalho e mais do que tudo, por me fazer rir todos os dias.

Agradeço a todos os funcionários da Imuno, da Técnica, do SAME, do Arquivo, da Pós-Graduação e da Biblioteca pela imensa ajuda em tudo.

Agradeço a Alexandra, Carlinhos, Gilmara, Ivanildo e Severino por todos os auxílios prestados.

Agradeço a FAPESP, pelo suporte financeiro indispensável ao desenvolvimento deste projeto.

Agradeço aos membros de qualificação, Bernardo Garicochea e Venancio Avancini Ferreira Alves pelas correções e sugestões desse estudo, e aos membros da banca examinadora desta dissertação, por aceitarem o convite e pela disposição em ler e argüir este trabalho.

Agradeço ao meu orientador de Iniciação Científica, Marcelo Menossi, pelo início dos meus ensinamentos.

Agradeço ao Fernando Soares, em nome de todo o departamento de Anatomia Patológica, onde realizei todos os meus experimentos.

Agradeço a enfermeira Erika, por toda a ajuda neste e nos demais projetos, pela confiança em compartilhar comigo algumas responsabilidades do GETH e por me ajudar nas análises estatísticas.

E por fim, agradeço aos meus orientadores, Benedito Mauro Rossi, Renata de Almeida Coudry e Dirce Maria Carraro, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela motivação e principalmente, pelo entusiasmo contagiante de todos os dias.

Esta conquista é para todos vocês!

RESUMO

Oliveira LP. **Avaliação de instabilidade de microssatélites e expressão imunoistoquímica das proteínas hMLH1 e hMSH2 em pacientes com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose.** São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Introdução: A síndrome de Lynch, ou câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), é comum, representando cerca de 4% dos CCR. Assim, torna-se importante o reconhecimento clínico e molecular dessas famílias. As técnicas utilizadas para o diagnóstico molecular são caras e trabalhosas, assim sendo, torna-se importante a identificação de métodos de rastreamento com boa relação custo-benefício. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é identificar, através da pesquisa de instabilidade de microssatélites - MSI (painel de 10 marcadores), e da expressão imunoistoquímica das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, pacientes portadores de alteração no sistema de reparo do DNA. Os indivíduos/famílias foram selecionados de acordo com os critérios clínicos de Bethesda ou Amsterdam para suspeita da síndrome de Lynch. **Resultados:** Foram estudados 95 pacientes não relacionados. Quanto à imunoistoquímica no tumor primário, 7,4% dos casos apresentaram perda de MLH1/PMS2, 15,8% de MSH2/MSH6 e 8,5% de proteínas isoladas. Não foi possível realizar a técnica de MSI nos adenocarcinomas emblocados em parafina por dificuldades na extração de DNA, que foi realizada em 26 amostras de tecido fresco oriundas do Banco de Tumores. Dos 26 casos analisados, 53,85% apresentaram MSS, 38,46% MSI-H e 7,69% MSI-L. Os resultados foram correlacionados com os dados clínicos, anatomopatológicos, e antecedentes familiares. Tumores no lado direito do cólon e presença de componente mucinoso apresentaram correlação com alteração da expressão protéica dos genes de reparo do DNA através de imunoistoquímica. Todos os casos com MSI-H apresentaram perda de expressão protéica, o que não ocorreu com os casos MSI-L e MSS. **Conclusão:** A técnica de imunoistoquímica no tumor primário colorretal é um método adequado para a identificação dos indivíduos portadores de alterações no sistema de reparo do DNA. A técnica de MSI fornece uma validação dos resultados

de imunoistoquímica. A correlação com os resultados de seqüenciamento direto dos principais genes de reparo é fundamental para o estabelecimento do valor preditivo dos testes avaliados.

SUMMARY

Oliveira LP. [Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry testing of hMLH1 and hMSH2 proteins in patients with suspect of hereditary nonpolyposis colorectal cancer]. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Introduction: The Lynch syndrome, or hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is common, representing about 4% of colorectal cancer (CCR). Thus, is very important to identify clinic and molecularly these families. The techniques are expensive and laborious; therefore, it is important to have screening methods with better cost-benefit relation. **Objective:** The aim of this study is to identify, using microsatellite instability evaluation- MSI (panel of 10 markers) and immunohistochemistry for the proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2, patients with defect in DNA mismatch repair system. The individuals/families were selected according to the clinical criteria (Amsterdam I/II or Bethesda) for Lynch syndrome. **Results:** Ninety-five non-related individuals were studied. Immunohistochemistry analysis showed 7,4% loss of expression of MLH1/PMS2, 15.8% of MSH2/MSH6 and 8.5% of one isolated protein. One was unable to perform the MSI technique in paraffin block tumors by difficulties in extracting the DNA from these samples. Thus, was carried out on 26 frozen samples from the Hospital Tumor Bank. Of the 26 cases examined, 53.85% were classified as MSS, 38.46% as MSI-H and 7.69% as MSI-L. The results were correlated with clinical and pathological data, and with the family history. Right-side tumors and those presenting mucinous component presented correlation with loss of expression of the DNA repair genes. All cases that demonstrated MSI-H also showed alteration in the protein expression and MSI-L and MSS samples had none. **Conclusion:** The use of the immunohistochemistry technique in the primary colorectal tumor is an appropriate method to identify individuals with defect in DNA mismatch repair system. The MSI technique supplies the validation of the results of the immunohistochemistry. The correlation with the results using direct sequencing of the repair genes is essential for the establishment of predictive value of the tests evaluated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sistema de Reparo do DNA.....	32
Figura 2	Padronização dos anticorpos.....	53
Figura 3	Adenocarcinomas colorretais com positividade para a proteína de reparo MSH6.....	54
Figura 4	Fotos de imunoistoquímica de casos com ausência de expressão protéica.....	57
Figura 5	Graus de diferenciação dos adenocarcinomas segundo a OMS.....	67
Figura 6	Fotos de lâminas mostrando casos de adenocarcinomas que apresentam <i>budding</i>	71
Figura 7	Fotos de lâminas de adenocarcinomas.....	72
Figura 8	Fotos de imunoistoquímica de casos com ausência de expressão protéica tanto no adenocarcinoma quanto no adenoma.....	74
Figura 9	Adenocarcinoma colorretal demonstrando perda de expressão da proteína de reparo MGMT.....	75
Figura 10	Teste de amplificação das amostras.....	82
Figura 11	Teste de amplificação das amostras extraídas.....	83
Figura 12	Teste de amplificação.....	85
Figura 13	Teste de amplificação dos primers.....	86

Figura 14	Teste de amplificação das amostras de parafina.....	87
Figura 15	Teste do kit Pico Pure.....	89
Figura 16	Teste de amplificação das amostras.....	92
Figura 17	Teste de amplificação das amostras.....	94
Figura 18	Teste de amplificação das amostras.....	96
Figura 19	Teste de amplificação das amostras.....	97
Figura 20	Eletrofluorograma derivado do <i>software GeneMapper</i>	100
Figura 21	Reprodução dos picos <i>Stutters</i> . Eletrofluorograma derivado do software GeneMapper.....	102
Figura 22	Amostras de DNA amplificadas com todos os primers.....	104
Figura 23	Eletrofluorogramas para um caso com perda de expressão protéica de MSH2/MSH6.....	109
Figura 24	Eletrofluorogramas para um caso com perda de expressão protéica de MLH1/PMS2.....	111
Figura 25	Eletrofluorogramas para um caso com perda de expressão protéica apenas para MLH1.....	113
Figura 26	Eletrofluorogramas para um caso classificado como MSI-L e sem perda de expressão protéica.....	115
Figura 27	Eletrofluorogramas para um caso com expressão protéica normal...	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios de Amsterdam I.....	7
Tabela 2	Critérios de Amsterdam II.....	7
Tabela 3	Critérios de Bethesda.....	8
Tabela 4	Critérios de Bethesda Revisados.....	9
Tabela 5	Sequência dos primers de MSI.....	44
Tabela 6	Avaliação da expressão das proteínas de reparo do DNA.....	55
Tabela 7	Discriminação da expressão protéica por imunoistoquímica em 86 pacientes com suspeita para SL.....	56
Tabela 8	Classificação clínica de acordo com os CAI, CAII, CCF e B em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	59
Tabela 9	Sexo em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	60
Tabela 10	Localização do adenocarcinoma em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	60
Tabela 11	Tumores primários em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	61
Tabela 12	Estadiamento T em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	62

Tabela 13	Estadiamento N em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	63
Tabela 14	Estadiamento M em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	64
Tabela 15	Invasão sanguínea em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	64
Tabela 16	Invasão linfática em relação à alteração na imunoistoquímica.....	65
Tabela 17	Invasão perineural em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	66
Tabela 18	Grau de diferenciação em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	66
Tabela 19	Infiltrado tipo Crohn em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	68
Tabela 20	Infiltrado linfocitário peritumoral em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	69
Tabela 21	Desmoplasia em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	69
Tabela 22	<i>Budding</i> em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	70
Tabela 23	Tipo histológico em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.....	71

Tabela 24	Tumores presentes nas famílias dos pacientes estudados em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo dos pacientes estudados.....	76
Tabela 25	Tamanho dos alelos encontrados.....	101
Tabela 26	Marcadores instáveis.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µl	microlitro
B	Critérios de Bethesda
CAI	Critérios de Amsterdam I
CAII	Critérios de Amsterdam II
CCF	Preenchimento de pelo menos três dos Critérios de Amsterdam
CCR	câncer colorretal
CEP	comitê de ética em pesquisa
CpG	dinucleotídeo cg
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxinucleotídeos tri-fosfato
EDTA	ácido etileno-diamino-tetraacético
FAM	6-carboxi-fluoresceína – fluoróforo azul
HE	Hematoxilina e Eosina
HNPCC	câncer colorretal hereditário sem polipose
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIZ	fluoróforo laranja
mg	miligrama
MgCl₂	cloreto de magnésio
MGMT	<i>O⁶-methylguanine DNA methyltransferase</i>
ml	mililitro
mM	milimolar
MSI	instabilidade de microssatélites
MSI-H	Instabilidade alta de microssatélites
MSI-L	Instabilidade baixa de microssatélites
MSS	Estabilidade de microssatélites
NaOH	hidróxido de sódio
NED	fluoróforo amarelo
ng	nanograma

OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rpm	rotações por minuto
SL	Síndrome de Lynch
VIC	fluorórofo verde

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer Colorretal	1
1.2	Síndrome de Lynch	4
1.3	Imunoistoquímica	20
1.4	Instabilidade de Microssatélites	24
1.5	Proteínas de Reparo	29
2	OBJETIVO	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Pacientes	34
3.1.1	Aspectos Éticos	34
3.1.2	Convocação dos Pacientes	34
3.1.3	Inclusão dos Pacientes	34
3.1.4	Seleção dos Pacientes	35
3.1.5	Dados Clínicos	36
3.2	Imunoistoquímica	36
3.2.1	Anticorpos	36
3.2.2	Protocolo para material em parafina	37
3.2.3	Protocolo para material congelado	39
3.2.4	Soluções para Imunoistoquímica	40
3.2.5	Classificação Histológica	41
3.3	Instabilidade de Microssatélites	43
3.3.1	Marcadores	43
3.3.2	Extração de DNA e Amplificação das Amostras do Banco de Tumores	46
3.3.3	Eletroforese	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Imunoistoquímica	49

4.2	Instabilidade de Microssatélites	80
4.2.1.	Marcadores	80
4.2.2	Extração de DNA e Amplificação das Amostras Emblocadas em Parafina	81
4.2.3	Extração de DNA e Amplificação das Amostras do Banco de Tumores	103
5	CONCLUSÃO	122
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

ANEXOS

Anexo 1 Termo de Consentimento

Anexo 2 Ficha de Dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

Todas as células existem sob estrita regulação de sinais para crescimento, apoptose, diferenciação, interação célula-célula e interação célula-matriz extracelular. O câncer é o resultado de um processo de múltiplas etapas, dirigidas por alterações genéticas que levam ao surgimento de um clone de células com vantagens proliferativas sobre as demais, além de modificar a arquitetura normal dos tecidos, levando progressivamente a disfunções (PELTOMÄKI 2005; CHAMMAS e NOWAK 2005). Os eventos genéticos sequenciais múltiplos envolvidos na tumorigênese resultam da ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor, o que permite escape das células da estrita regulação normal (LIU et al. 2005). Tais alterações genéticas podem estar presentes nas linhagens germinativas, como já foi descrito em determinadas síndromes predisponentes ao câncer, ou na forma de mutações somáticas, sendo responsável pela maioria dos casos esporádicos das neoplasias.

O câncer colorretal (CCR) é uma das causas mais frequentes de morte por câncer nos países industrializados, tanto para homens quanto para mulheres, com uma incidência anual de 800.000 novos casos no mundo, representando 8,5% de todos os novos tumores (GATALICA e TORLAKOVIC 2008). No Brasil, o CCR é o quarto tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em homens - depois de pulmão, estômago e próstata, e o terceiro mais comum em mulheres - depois de

mama e colo e útero (FERLAY et al. 2001). Estima-se que o CCR seja responsável por 13% das mortes relacionadas ao câncer (ASHKTORAB et al. 2007). Em 2008, segundo estimativa de incidência do Instituto Nacional do Câncer (Ministério da Saúde 2007), o país poderá ter 26.990 casos, sendo 12.490 em homens e 14.500 em mulheres, ou seja, esses valores correspondem a 13 novos casos para 100 mil homens e 15 novos casos para 100 mil mulheres. A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento já aumentam a partir dos 40 anos. As estatísticas do IARC para o Brasil são calculadas de acordo com os dados do Registro da região de Campinas (Campinas, Joaquim Egídio, Souza, Nova Aparecida e Barão Geraldo), de 1991 a 1995 e de acordo com os dados do Registro de Goiânia, de 1995 a 1998 (PARKIN et al. 2003).

Nos últimos anos, a incidência de CCR tem aumentado em áreas antes consideradas de baixo risco. Acredita-se que isso se deva ao envelhecimento das populações, à adoção de estilos de vida com tendência mais sedentária e a um aumento na preferência e aceitação de dietas pouco saudáveis (FRANCO e FRANCO 2005). A história natural da doença é condizente com uma prevenção eficaz: o CCR é a consequência final de uma série de erros genéticos que se acumulam durante vários anos, sendo o segundo câncer mais prevalente no mundo, depois do câncer de mama. Estima-se hoje que, globalmente, haja 2,4 milhões de pessoas vivas com esse diagnóstico nos últimos 5 anos. O risco acumulado de desenvolvimento do CCR ao longo da vida é de 6% (FERLAY et al. 2001). A prevalência do CCR tem aumentado rapidamente, enquanto que as taxas de mortalidade têm caído como resultado de melhoras no tratamento e programas de rastreamento e sobrevida mais eficazes (ROSSI e SILVA 2005).

Embora as síndromes familiares sejam responsáveis por apenas uma pequena proporção dos casos de CCR (em torno de 6% a 8%), indivíduos com predisposição hereditária têm o processo carcinogênico facilitado, com aumento do risco de desenvolvimento de CCR em relação aos casos esporádicos, que pode chegar entre 80% e 100% (FEARNHEAD et al. 2002). As principais síndromes hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC - *Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*), também chamada de Síndrome de Lynch.

O modelo proposto por KNUDSON (1971), chamado de “*two-hit theory*”, ajudou no entendimento, em especial, das síndromes de predisposição ao câncer. Segundo o modelo, dois eventos são necessários para o desenvolvimento da doença, ou seja, um indivíduo que herda um alelo mutado para determinado gene supressor de tumor necessita da inativação do segundo alelo, este normal, evento através do qual a função do gene é perdida, contribuindo significativamente a neoplasia. Já nos casos esporádicos, a inativação dos dois alelos se faz necessária para o desenvolvimento da doença, já que neste caso, os dois alelos herdados são normais, ou seja, possuem sua atividade inalterada. O característico acometimento mais tardio dos casos esporádicos é resultante da necessidade de inativação de ambos os alelos ao longo da vida do indivíduo para a neoplasia.

1.2 SÍNDROME DE LYNCH

A primeira família descrita com a síndrome foi em 1913, por Warthin, patologista da Universidade de Michigan, como a família de câncer G, que apresentava muitos casos de câncer. Depois de 12 anos, o próprio Warthin escreveu um artigo sobre a família G relatando que a maioria dos tumores ocorreu no cólon, estômago ou útero. Em 1966, Henry Lynch identificou duas famílias, denominadas N e M (de Nebraska e Michigan). Notando as semelhanças entre as famílias descritas, o sucessor de Warthin entrou em contato com Lynch para uma reunião, onde foram catalogados 600 descendentes da família G. Os pesquisadores verificaram um inequívoco padrão de herança autossômico dominante nas seis gerações desta família. Foram sugeridos para explicar o mecanismo desta doença apenas agrupamentos ao acaso ou exposições ambientais compartilhadas. Entretanto, foi observado que apenas alguns órgãos estavam sob maior risco. Além disso, o cólon proximal apresentava um risco particular, pois os indivíduos acometidos apresentavam idade de acometimento anormalmente reduzida. Outra observação importante da família G foi a de que os filhos dos membros afetados na família continuavam a apresentar risco aumentado de câncer por muitas gerações, enquanto que os filhos dos membros não afetados da família não apresentavam (BOLAND 2005; VASEN 2005).

No final de 1970 tais famílias eram referidas como “fraternidades cancerosas”, “câncer de cólon hereditário sítio-específica” e “síndrome de câncer familiar”. De 1970 até 1990 muitos estudos se esforçaram em entender biologicamente a doença, e em 1984 o termo “Síndrome de Lynch” foi usado pela

primeira vez em referência a Henry Lynch. Em 1985 a síndrome foi nomeada de HNPCC, para evidenciar o fato de que esta doença era distinta da FAP, mas focava toda a atenção para os tumores colorretais apenas (BOLAND 2005).

Nos últimos anos intensificaram-se os debates em relação ao nome da síndrome, de modo que o nome HNPCC, utilizado com maior frequência para caracterizá-la, não seria o mais adequado, já que a expressão “sem polipose” poderia excluir famílias cujos indivíduos apresentam um ou mais adenomas. Além disso, os pacientes de famílias denominadas como HNPCC não apresentam predisposição somente ao câncer colorretal, mas também a outros tumores. Desta maneira, o termo Síndrome de Lynch tem sido utilizado para identificar pacientes portadores de câncer colorretal e tumores extracolônicos que preencham os critérios clínicos (BOLAND 2005).

A Síndrome de Lynch é uma doença autossômica dominante, responsável por 2% a 6% dos casos de CCR (MÜLLER et al. 2001; JONG et al. 2004; BOLAND 2005). É caracterizada por um pequeno número de pólipos, acometimento em idade precoce, mutações germinativas nos genes de reparo do DNA, e, por isso, um processo carcinogênico acelerado no cólon, já que, com um alelo inativado devido à mutação herdada, a inativação do alelo normal remanescente sinaliza para o desenvolvimento da neoplasia (ROSSI et al. 2002; BAUDHUIN et al. 2005; VASEN 2005). A razão adenoma-carcinoma nesses indivíduos é de praticamente 1:1, enquanto a estimativa equivalente para a população em geral é de 30:1. Isso ocorre devido a uma acelerada transição adenoma-carcinoma (FISHEL 2001; JASS et al. 2002). Acredita-se que a maioria dos pólipos adenomatosos não tratados nesses indivíduos sofre transformação maligna.

Os portadores da Síndrome de Lynch possuem risco aumentado de desenvolver CCR (60% a 70% aos 70 anos), carcinoma endometrial (30% a 40% aos 70 anos) e, com menores riscos, carcinomas de intestino delgado, de células transicionais do trato urinário superior, câncer de ovário, câncer de estômago, tumores cerebrais (Síndrome de Turcot), e tumores de glândulas sebáceas (Síndrome de Muir-Torre) (HENDRIKS et al. 2006a).

Em virtude das diferentes manifestações da síndrome, existe ainda a recente sugestão de classificá-la como Lynch I, Lynch II e Lynch III. Os portadores de CCR seriam caracterizados como Lynch I, os portadores de tumores extracolônicos como Lynch II e os portadores de tumores hematológicos, cerebrais e gastrointestinais, espectro de tumores característico de portadores de duas mutações germinativas nos genes de reparo, seriam caracterizados como Lynch III (FELTON et al. 2007a).

O risco cumulativo de desenvolvimento de CCR nos USA é de aproximadamente 6%. Mais de 15% dos casos são atribuíveis a predisposições herdadas ou familiares (HENDRIKS et al. 2006a). Os pacientes com síndrome de Lynch possuem de 60% a 80% de risco de desenvolver câncer colorretal durante a vida (GOECKE et al. 2006).

O critério diagnóstico para Síndrome de Lynch é controverso devido a variações de fenótipos clínicos associados à síndrome nas diferentes áreas ou países (WANG et al. 2007). Atualmente, o diagnóstico clínico da síndrome de Lynch tem como base os antecedentes familiares de câncer, de acordo com os critérios de Amsterdam I e II e a suspeita clínica é realizada através dos critérios de Bethesda (VASEN 2005).

Em 1991, o Grupo Colaborativo Internacional (ICG/HNPCC) publicou os chamados Critérios de Amsterdam I, com a intenção de promover uma padronização internacional no diagnóstico clínico da Síndrome de Lynch (VASEN et al. 1991) (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios de Amsterdam I.

-
- Pelo menos três membros de uma mesma família com tumores relacionados;
 - Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
 - Pelo menos duas gerações acometidas;
 - Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
 - Exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP).
-

Os Critérios de Amsterdam I tiveram aceitação internacional e são de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico, porém, foram criticados por serem muito restritivos e não considerarem os tumores extracolônicos. Por isso, em 1999, o mesmo ICG/HNPCC acrescentou novos critérios aos anteriormente estabelecidos, criando desta forma os Critérios de Amsterdam II (VASEN et al. 1999) (Tabela 2).

Tabela 2 - Critérios de Amsterdam II.

-
- Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR/tumor extracolônico;
 - Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
 - Pelo menos duas gerações acometidas;
 - Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
 - Exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP);
 - Adenocarcinoma de endométrio;
 - Adenocarcinoma de intestino delgado;
 - Carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais (pelve renal e ureter).
-

O espectro de diagnóstico da Síndrome de Lynch foi ampliado com os novos Critérios de Amsterdam II, entretanto, ainda existem críticas, principalmente devido à dificuldade de diagnóstico clínico em famílias pequenas, com poucos descendentes. O uso dos critérios de Amsterdam alcançou o seu propósito original de identificar as famílias portadoras, mas a sua baixa sensibilidade restringe muito o número de pacientes que poderiam ser avaliados com testes genéticos.

Dessa maneira, visando melhorar o rastreamento de pacientes, em 1996, após um simpósio internacional sobre HNPCC/Síndrome de Lynch, foram propostas algumas recomendações, conhecidas como Critérios de Bethesda, com o intuito de identificar indivíduos que deveriam ser submetidos aos testes genéticos (BOLAND et al. 1998) (Tabela 3).

Tabela 3 - Critérios de Bethesda.

-
- Indivíduos que preenchem os Critérios de Amsterdam;
 - Indivíduos com dois tumores relacionados à síndrome, incluindo CCR sincrônico e metacrônico ou associado a tumores extracolônicos;
 - Indivíduos com CCR e um parente de primeiro grau com CCR e/ou tumor extracolônico relacionado à síndrome e/ou adenoma colorretal; um dos tumores diagnosticados antes dos 45 anos, e o adenoma diagnosticado antes dos 40 anos;
 - Indivíduos com CCR ou câncer endometrial diagnosticado antes de 45 anos;
 - Indivíduos com CCRs no cólon direito com padrão histológico indiferenciado (sólido/cribiforme) antes dos 45 anos;
 - Indivíduos com CCR com células em anel de sinete diagnosticado antes dos 45 anos;
 - Indivíduos com adenomas diagnosticados antes dos 40 anos.
-

Posteriormente, em 2004, os Critérios de Bethesda foram revisados em workshop do *National Cancer Institute*, conforme Tabela 4 (URSO et al. 2008).

Tabela 4: Critérios de Bethesda Revisados.

-
- CCR diagnosticado em paciente com menos de 50 anos;
 - Presença de CCR sincrônico ou metacrônico ou outro tumor extracolônico associado a síndrome, independente da idade;
 - CCR com histologia MSI-H* diagnosticado em paciente com menos de 60 anos;
 - CCR diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau com tumor relacionado à síndrome, com um dos tumores tendo sido diagnosticado antes dos 50 anos;
 - CCR diagnosticado em um ou mais parente de primeiro ou segundo graus com tumores relacionados à síndrome, independente da idade.
-

* A histologia MSI-H representa a presença de linfócitos infiltrando o tumor, reação linfocítica Crohn-like, diferenciação mucinosa ou em anel se sinete ou padrão de crescimento medular.

Dessa maneira, os critérios diagnósticos para a síndrome de Lynch são hierárquicos, que incluem a suspeita clínica, através do critério de Bethesda até a definição da síndrome, realizada pelo preenchimento dos critérios de Amsterdam, de forma que, ao se definir a síndrome, os critérios se tornam sobrepostos.

Apesar do conhecimento desses critérios, cerca de 85% dos CCR ainda são diagnosticados em estágio avançado (SPEIGHTS et al. 1991; AVERBACH e BORGES 2005. Pela elevada incidência, alta prevalência de indivíduos em fase sub-clínica, existência de precursores conhecidos, possibilidade de diagnóstico precoce, e, benefícios do tratamento e do seguimento, famílias/indivíduos com suspeita de síndrome de Lynch são elegíveis para estratégias de prevenção primária e secundária (BAUDHUIN et al. 2005; GOULART et al. 2005).

Dentre os conceitos epidemiológicos, o rastreamento é um dos mais importantes. Rastreamento pode ser definido, segundo MORRISON (1998), como “a investigação de pessoas assintomáticas a fim de classificá-las como possuindo alta ou baixa probabilidade de desenvolver uma determinada doença”. O objetivo básico de uma estratégia de rastreamento é detectar uma doença antes de sua manifestação clínica, em uma fase em que ela possa ser tratada com altos índices de cura. A extensão deste objetivo é reduzir a morbidade e a mortalidade atribuídas à doença. As características ideais de um instrumento de rastreamento são: segurança, boas sensibilidade e especificidade, boa relação custo-efetividade, fácil aplicação, e, principalmente, possibilitar formas de tratamento menos agressivas em doenças, devido a diagnósticos mais precoces. Além disso, aplicar estratégias de seguimento restritas aos indivíduos considerados como de alto risco.

Apropriados testes pré-sintomáticos podem ser oferecidos para reduzir a mortalidade entre os membros das famílias de risco e seus parentes fora de risco podem evitar um seguimento intensivo desnecessário e incerto. É essencial identificar indivíduos com risco aumentado para oferecer programas de seguimento adequados para prevenir o desenvolvimento de tumores ou reconhecê-los em estágio precoce. A colonoscopia é, atualmente, o mais importante recurso, útil não apenas para o diagnóstico, como também para o estadiamento e tratamento do CCR. Possui elevada sensibilidade e especificidade, além de permitir a execução de biópsias e remoção de lesões, reduzindo significativamente a incidência e a mortalidade do CCR. A Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society - ACS*) recomenda a colonoscopia a cada 5 anos a partir dos 40 anos, ou 10 anos antes do diagnóstico mais precoce se o indivíduo tiver dois ou mais parentes de primeiro grau

com CCR, ou um único parente com CCR ou pólipos adenomatosos diagnosticados antes dos 60 anos (HENDRIKS et al. 2006a). Para as mulheres, também se recomenda realizar exames de urina, biópsia aspirada de endométrio e ultrassonografia transvaginal anualmente a partir de 30-35 anos.

O seguimento de famílias com diagnóstico clínico e/ou molecular da Síndrome de Lynch deve ser feito com base nas seguintes orientações: colonoscopia com 1-2 anos de intervalo e início entre os 20-25 anos; ultrassonografia transvaginal anual, com início entre os 25-35 anos; ultrassonografia abdominal e pélvica anual, com início entre os 25-35 anos; exame de urina tipo I e citologia urinária anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais; endoscopia digestiva alta com 1-3 anos de intervalo, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com tumores gástricos; dosagem de CA-125 anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com câncer de ovário (ROSSI et al. 1998).

Para pacientes com Síndrome de Lynch deve ser considerada, na escolha da conduta terapêutica, a colectomia total e anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Essa conduta é indicada em razão da alta probabilidade de o indivíduo desenvolver nova lesão colônica no decorrer de sua vida. A histerectomia ou ooforectomia é uma opção para mulheres após terem engravidado, de acordo com recente evidência de eficácia (CASE et al. 2008).

A era da genética molecular para a síndrome de Lynch começou nos anos 1990, quando PELTOMÄKI et al. (1993) identificaram um *locus* no cromossomo 2p16, através de análise de ligação (*linkage analysis*), como sítio para um gene de predisposição para a síndrome de Lynch. Depois de um ano, um segundo locus no

cromossomo 3p21 foi identificado por LINDBLOM et al. (1993), na Suécia. Nessa época, demonstrou-se também que tumores de pacientes com síndrome de Lynch apresentavam uma mudança molecular característica, chamada de fenótipo de erro de replicação (RER), o que atualmente é conhecido como MSI (Instabilidade de Microssatélites). O reconhecimento subsequente de que a MSI é consequência de defeito no sistema de reparo de erros de replicação do DNA levou à descoberta, nos loci 2p16 e 3p21, dos genes *MSH2* e *MLH1*, considerados os principais responsáveis pela síndrome de Lynch. Os dois genes são responsáveis por aproximadamente 85-90% das mutações conhecidas associadas à síndrome (PELTOMÄKI 2005; GOECKE et al. 2006). Posteriormente foram identificados o locus 2q31-33, correspondente ao gene *PMS1* (postmeiotic segregation 1), o locus 7p22, correspondente ao gene *PMS2* (postmeiotic segregation 2) e o locus 2p16, correspondente ao gene *MSH6/GTBP* (mutS homolog 6) (DRUMMOND et al. 1994; PALOMBO et al. 1995). Mutações em *MLH3* e *EXO1* foram encontradas tanto em famílias que preenchem os critérios de Amsterdam quanto em famílias que não preenchem, porém com relevância biológica ainda não esclarecida (LAGERSTEDT et al. 2007).

Mutações no sistema de reparo causam freqüentes alterações nos tratos poliômico ou em seqüências repetitivas de bases, espalhadas pelo DNA, também conhecidas como microssatélites. Cerca de 90% dos indivíduos portadores de CCR e síndrome de Lynch apresentam instabilidade de microssatélites (MSI) (CHAPELLE 2005).

O sistema de reparo do DNA realiza a função de revisão ou integridade, durante a replicação, mantendo sua fidelidade por reparar os danos de mal-

pareamento de bases ou inserção/deleção de alças de DNA (*loops*). Este processo é altamente conservado desde a *Escherichia coli* até os mamíferos. As proteínas de reparo também são importantes no processamento de erros de bases incorporados por danos ao DNA incluindo o *O⁶-methylguanine 8-oxoguanine*, adutos de cisplatina e fotoprodutos de ultravioleta. Multifuncionais, as proteínas também contribuem para a checagem dos pontos G1 e G2 do ciclo celular, na resposta apoptótica iniciada por danos ao DNA e para fidelidade da recombinação genética (FELTON et al. 2007b). Células que perdem a função efetiva de reparo do DNA acumulam mutações em taxas muito altas, geralmente em genes importantes na carcinogênese, como o *APC*, *TP53*, *Kras*, entre outros. Como os genes do sistema de reparo estão envolvidos também na sinalização da apoptose induzida por danos, sua inativação, além de aumentar a ocorrência de mutações, também proporciona vantagens seletivas de crescimento para as células alteradas (PELTOMÄKI 2005). Uma mutação que inativa algum desses genes leva a um acúmulo de mutações na célula a cada divisão celular, resultando na transformação maligna (BLANES e DIAZ-CANO 2006).

O fenótipo MSI-H requer a inativação bi-alélica do gene de reparo responsável pelo desenvolvimento do tumor, através do modelo “two-hit”. Nos tumores da síndrome de Lynch a inativação somática do alelo selvagem remanescente pode ocorrer por diferentes mecanismos: perda de heterozigose (LOH), mutação somática e metilação do promotor.

As mutações somáticas como o segundo hit têm sido encontradas tanto em tumores deficientes para *MLH1* quanto para *MSH2*, apesar de em baixas frequências. A perda do alelo selvagem tem sido detectada em 33% a 86% e acredita-se que esta seja o maior mecanismo somático para o segundo hit. A contribuição da metilação de

MLH1 como segundo hit é controversa, pois muitos pesquisadores acreditam que esta seja uma diferenciação entre os tumores da síndrome de Lynch e os esporádicos. Entretanto, a metilação de *MLH1* tem sido detectada de 0% a 46% dos CCRs da síndrome de Lynch, com freqüente metilação em adenomas colorretais (53%). Dessa maneira, a relevância da metilação mono-alélica na síndrome de Lynch não está excluída. Os padrões de eventos somáticos diferem, dependendo do tecido e da mutação germinativa, o que pode explicar, em parte, a susceptibilidade para tumores em diferentes órgãos da síndrome de Lynch (IMAI e YAMAMOTO 2008).

O reconhecimento de indivíduos e famílias com predisposição hereditária ao câncer de acordo com características genéticas e clínicas, somado à vigilância intensiva e a programas de manejo, podem contribuir de forma substancial para melhores resultados relacionado ao CCR. A análise de MSI pode ser útil nesse reconhecimento, contribuindo na decisão de indicação do teste de predisposição germinativa.

Quando se identifica a mutação germinativa em uma família, deve-se oferecer o teste genético aos indivíduos sob risco, condição *sine qua non* para o diagnóstico definitivo de portadores assintomáticos da predisposição ao câncer (ENG et al. 2000). Além disso, a falta das proteínas de reparo no tecido tumoral está altamente relacionada com a MSI (BAUDHUIN 2005).

O freqüente achado de mutações germinativas em um dos genes de reparo do DNA em famílias suspeitas para síndrome de Lynch não só confirma o diagnóstico, como também identifica os membros da família que são portadores e precisam, portanto, de um seguimento mais agressivo. Devido ao fato de que os filhos de pais afetados nestas famílias também devem ser considerados sob risco, mesmo sem as

análises de mutação terem sido realizadas, o real benefício do rastreamento de determinada mutação, freqüentemente reside na habilidade de caracterizar e assim, excluir os não portadores (LYNCH et al. 2007).

Devido à heterogeneidade do espectro de mutações nos genes do Sistema de Reparo do DNA, o rastreamento das mutações é demorado e caro. Assim, aliado à história familiar, MSI e a imunoistoquímica podem ser utilizadas para identificar famílias elegíveis para a análise de mutação. Em 1997, o critério de Bethesda propôs que as famílias que preenchessem tais critérios deveriam ser selecionadas para a análise de MSI. A técnica de MSI e de imunoistoquímica é usada como pré-seleção para selecionar indivíduos elegíveis para análises de mutação do DNA no sangue através de DGGE, MLPA e seqüenciamento, o que pode evitar análises demoradas, caras e desnecessárias.

De acordo com JONG et al. (2004), fazem parte da síndrome os genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *PMS1*. O banco de dados de mutações descritas do *International Society of Hereditary Gastrointestinal Tumors* (www.insight-group.org) publicou no ano de 2004 em seu levantamento 448 mutações patogênicas, sendo 50% em *MLH1*, 39% em *MSH2* e 7% em *MSH6*. Já o mais recente banco de dados do Canadá (www.med.mun.ca/MMRvariants), baseado em mutações publicadas na literatura revela alterações nos genes sendo 39% em *MLH1*, 40% em *MSH2*, 16% em *MSH6* e 6% em *PMS2* (NILBERT et al. 2008).

Mutações patológicas têm sido encontradas em 88% de famílias que preenchem os critérios de Amsterdam, em 59% de famílias que não preenchem os critérios de Amsterdam e em 80% de pacientes que apresentam MSI (LYNCH et al. 2007).

Um estudo recente sugere, através de análises de segregação de CCR familiar sem a presença de mutações nos genes de reparo relacionados à síndrome, a existência de raros alelos em padrão de herança recessiva. A proteína MLH3 interage com MLH1 através da porção C-terminal e a proteína EXO1 é uma nuclease 5'-3' específica de ligação tanto ao MLH1 quanto ao MSH2, participando das funções de reparo e de recombinação. Foram encontradas mutações *missense* e SNPs nestes genes em pacientes com CCR familiar, mas em menor frequência ou ausentes em controles saudáveis. O estudo concluiu que tais alterações em alelos podem estar envolvidas no risco de CCR familiar, possivelmente como genes modificadores ou de penetrância reduzida (KIM et al. 2007).

Em virtude das diferentes características apresentadas por algumas famílias, existe a sugestão de que as famílias que preenchem os critérios clínicos para síndrome de Lynch, mas nas quais não foram detectadas mutações em nenhum dos genes de reparo, não sejam consideradas como portadoras da síndrome. Estas famílias representam um importante grupo para estudos clínicos e moleculares, pois pouco se sabe sobre as alterações genéticas responsáveis pelo câncer nessas famílias. Dentro da heterogeneidade clínica do CCR familiar, um subgrupo de indivíduos com maior idade de acometimento, tumores MSS localizados do lado esquerdo e ausência de tumores em outros locais tem sido caracterizadas recentemente como “Câncer Colorretal Familiar do tipo X”. Tais famílias apresentam aumento de risco de desenvolvimento apenas de CCR, e este risco parece ser menor do que o apresentado pelas famílias que apresentam mutação nos genes de reparo (BOLAND 2005; CASE et al. 2008).

Novos estudos metilação germinativa hemi-alélica de *MLH1*, chamada de epimutação, como um novo caso na síndrome de Lynch. Foi demonstrada a transmissão vertical do alelo metilado de *MLH1*. Outros autores mostraram epimutação germinativa de *MLH1* em um homem que teve o alelo metilado herdado de sua mãe, na qual o mesmo alelo não se encontrava metilado, sugerindo que a epimutação surgiu como um evento de novo. A epimutação herdada em *MSH2* também já foi encontrada em uma família com síndrome de Lynch (IMAI e YAMAMOTO 2008).

Mutações somáticas no oncogene *BRAF* têm sido usadas para distinguir entre tumores associados à Síndrome de Lynch e tumores esporádicos que exibem instabilidade de microssatélites. As mutações em *BRAF* foram primeiramente demonstradas em melanomas e outros tipos de cânceres. Aproximadamente 10% dos cânceres colorretais esporádicos possuem mutações em *BRAF*, sendo que a mutação é quase sempre a V600E. Existe forte associação entre o tipo da mutação em *BRAF* e a MSI nos CCR e, mais do que isso, tal mutação é freqüentemente associada à metilação do promotor do gene *MLH1*, e quase nunca encontrada em tumores da síndrome de Lynch (LAGERSTEDT et al. 2007).

Assim, a análise de *BRAF* no tecido tumoral é uma estratégia efetiva e de baixo custo para distinguir entre o evento somático da hipermetilação e uma possível mutação germinativa no gene *MLH1*. Se a mutação específica V600E for encontrada em *BRAF*, no DNA tumoral, a análise de mutação no gene *MLH1* não será então indicada (HENDRIKS et al. 2006a). No estudo de LAGERSTEDT et al. (2007), a presença da mutação V600E excluiu o diagnóstico da Síndrome de Lynch em 5

famílias de 7 que não preenchiam os critérios de Amsterdam e que mostraram ausência de expressão de MLH1.

A síndrome de Lynch representa um problema altamente significativo dentro das síndromes hereditárias por ser uma das mais comuns, com incidência entre 1:2000 e 1:660 (CHAPELLE 2005). É fundamental que famílias/pacientes sob risco realizem programas de rastreamento e protocolos de manejo, a fim de otimizar a prevenção de câncer. Vale ressaltar que ainda não existem dados sobre a incidência de síndrome de Lynch no Brasil.

A grande maioria dos estudos foi realizada em populações predominantemente brancas, de países industrializados. A situação pode ser diferente em países menos industrializados e em populações não-brancas (CHAPELLE 2005).

Poucos estudos sobre a síndrome de Lynch foram publicados no Brasil. Em estudo no estado de Minas Gerais os pesquisadores detectaram 25% de MSI nos pacientes (FUZIKAWA et al. 1997). CARVALHO et al. (2005) encontraram 22 (12%) pacientes dentre 184 que apresentaram instabilidade para BAT26. COSSIO et al. (2007) avaliaram os marcadores BAT26 e BAT25 em 216 pacientes do sul do Brasil quanto as suas variações polimórficas. Encontraram 6% e 7% de variação alélica, respectivamente, evidenciando a necessidade dos estudos comparativos entre tecido tumoral e normal de cada paciente. ROSSI et al. (2002) analisaram 25 famílias não relacionadas, suspeitas de síndrome de Lynch. Foram encontradas 10 mutações (40%), sendo 8 no gene *MLH1* e 2 no gene *MSH2*. Esse resultado não é coincidente com os dados da literatura, onde existe um equilíbrio na frequência de mutações nestes dois principais genes de reparo. Portanto, esses resultados sugerem que o perfil de mutações nos genes de reparo nas famílias brasileiras possa ser diferente do

perfil de famílias européias (principalmente finlandesas e holandesas) e americanas. Recentemente, um estudo revelou duas mutações germinativas em *MLH1* não descritas encontradas em pacientes brasileiros (DOMINGUEZ 2008). Com relação à América do Sul, poucos trabalhos foram publicados até o momento, com séries pequenas de pacientes e que não elucidam os pontos aqui colocados (SARROCA et al. 2000; SARROCA et al. 2003, 2005; GIRALDO et al. 2005).

Cabe ressaltar ainda que o tratamento e o acompanhamento de pacientes com síndrome de Lynch é diferente em relação aos pacientes com CCR esporádico (MÜLLER et al. 2001; VASEN 2005). Para pacientes com câncer de cólon e síndrome de Lynch deve ser considerada, por exemplo, na escolha da conduta terapêutica, a colectomia total e anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Tal conduta é indicada em razão da alta probabilidade de o indivíduo desenvolver nova lesão colônica no decorrer de sua vida. Por isso, é importante identificar, entre os pacientes com CCR, aqueles portadores da síndrome de Lynch, pois, não só o paciente poderá se beneficiar de uma melhor definição da conduta terapêutica a ser empregada, como também os familiares assintomáticos portadores da síndrome poderão ser identificados.

Finalmente, é importante estudar os genes de reparo relacionados à síndrome de Lynch, particularmente em razão de evidências de suas heterogeneidades fenotípica e genotípica (LYNCH et al. 2005). O conhecimento na área adquirido pode ser traduzido em rastreamento e protocolos de manejo específicos. No futuro, esse conhecimento pode, até mesmo, contribuir para o desenvolvimento de drogas alvo-específicas com base molecular, através de onco-genômica, proteômica, rastreamento altamente direcionado (*high-throughput screening*) e bioinformática.

1.3 IMUNOISTOQUÍMICA

A imunoistoquímica é uma técnica que possui grande destaque em detectar alterações moleculares como prática clínica de exames laboratoriais, unindo os achados dos estudos da pesquisa básica à rotina de diagnóstico dos pacientes, já que se trata de uma técnica de custo acessível a muitos laboratórios. Muitas patologias resultam em produção anormal de moléculas, o que através dos avanços da biologia molecular, passam a ser detectáveis, permitindo melhor diagnóstico, prognóstico ou mesmo planejamento do tratamento das doenças.

O princípio básico da imunoistoquímica constitui-se na defesa imunológica do organismo estimulada pela exposição ao que lhe é estranho. Na resposta imunológica adquirida humoral os linfócitos B são capazes de desenvolver anticorpos específicos contra antígenos estranhos, visando sua posterior destruição.

Assim, a imunoistoquímica se baseia no desenvolvimento de anticorpos específicos (monoclonais) que reconhecem as proteínas de interesse do tecido, simulando a resposta imunológica. A técnica mais usada para produção de anticorpos monoclonais consiste na imunização de camundongos com o antígeno objeto de estudo. Os linfócitos B coletados do baço ou linfonodo do camundongo são fusionados a uma linhagem tumoral de linfócito B imortalizada (hibridoma). Os hibridomas cultivados sofrem posteriormente uma triagem buscando os clones que produzem o anticorpo de interesse (ABBAS et al. 2003).

A técnica de imunoistoquímica é utilizada para detectar a presença de antígeno nos cortes histológicos de tecidos pelo uso de anticorpo específico para aquele antígeno ligado a uma enzima. A enzima converte um substrato incolor em

uma substância insolúvel colorida que se precipita no sítio do corte do tecido onde está o anticorpo e também, o antígeno, observado posteriormente por microscopia de luz convencional.

A interpretação diagnóstica através dos métodos imunoistoquímico depende, na maioria das vezes, da boa qualidade dos espécimes utilizados e da preservação dos seus antígenos, que requer cuidados prévios ao longo de toda a rotina histopatológica, incluindo obtenção, o manuseio e a fixação adequados. O uso de fixadores à base de formaldeído pode alterar, destruir ou “mascarar” alguns antígenos ou epítomos, dada à sua composição e processo de ligação às moléculas, formando pontes aldeído-proteína e alterando a estrutura terciária dos antígenos, que podem prejudicar as ligações entre antígeno e anticorpo (SANTOS et al. 1999).

As amostras fixadas em formalina, especialmente quando não é possível obter o controle do pH ou do tempo de fixação, requerem recuperação antigênica para a grande maioria dos epítomos habitualmente pesquisados, já que este processo elimina as ligações cruzadas entre as moléculas, incluindo entre certas cadeias de aminoácidos não hidrolisados por digestão química (SANTOS et al. 1999).

A imunoistoquímica é indicada para mutações que resultam em proteína truncada, como as *nonsense*, *frameshift*, *splice site mutations* e grandes rearranjos cromossômicos. Mutações *missense* mudam a composição da proteína devido a troca do aminoácido. Os efeitos fenotípicos são em princípio mais drásticos quanto maior for a diferença na natureza química das cadeias laterais dos resíduos dos aminoácidos trocados, e também dependem altamente do papel que esse resíduo desempenha na estrutura e função da proteína, podendo resultar na inativação da proteína, ou em uma atividade anormal da mesma. Assim, a significância patológica destas mutações

é incerta, já que testes de funcionalidade para acessar a competência das proteínas de reparo *in vitro* não está disponível atualmente. Assim, muitas das mutações *missense* são caracterizadas como “variantes não classificadas”, que não servem, portanto, aos propósitos diagnósticos, já que nestes casos a proteína pode ser funcionalmente anormal, mas ainda ser detectada na imunoistoquímica (HENDRIKS et al. 2006a).

As mutações *nonsense* ocorrem quando a troca das bases gera um códon de terminação, o que geralmente culmina com a formação de uma proteína truncada. As mutações *frameshift* ocorrem quando a inserção ou deleção de bases muda a fase de leitura do DNA, podendo também gerar um códon de terminação prematura e conseqüentemente uma proteína truncada. As *splicesite mutations* ocorrem quando mutações nas regiões de *splicing* levam a sítios alternativos de *splicing* podendo resultar em um processamento errado do RNA.

A grande maioria das mutações nos genes *MLH1* e *MHS2* resultam em expressão imunoistoquímica anormal de suas respectivas proteínas (BOLAND 2005; KIRK 2006). Portanto, outra ferramenta diagnóstica importante é a análise da expressão imunoistoquímica dessas proteínas. A pesquisa da expressão imunoistoquímica das proteínas MLH1 e MSH2, no tecido tumoral de pacientes suspeitos de síndrome de Lynch, tem se mostrado eficaz como exame de rastreamento para indicação do seqüenciamento do respectivo gene (MÜLLER et al. 2001; BAUDHUIN 2005). Apesar de ainda não haver consenso na literatura sobre a indicação de investigação do gene *MSH6*, o número de famílias com mutações detectadas em *MSH6* tem aumentado substancialmente (JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000). Até o momento, a freqüência de mutação em *MSH6* nas famílias com síndrome de Lynch varia bastante de acordo com a população estudada e o número

de pacientes analisados, variando de 6% a 16% (DOVRAT et al. 2005). LINDOR et al. (2002) encontraram 100% de sensibilidade da imunoistoquímica na detecção de MSI com amostras de 1.144 pacientes considerados de alto risco para CCR.

Como as proteínas de reparo do DNA formam heterodímeros, padrões de imunoistoquímica distintos são esperados. O reconhecimento de erros de bases simples e de loops de inserção e deleção (IDLs) é realizado pelo heterodímero MSH2 e MSH6 (MutS α), enquanto que o heterodímero MSH2 e MLH3 reconhece os IDLs na falta de MSH6. O heterodímero MLH1 e PMS2 (MutL α) medeia a interação do reconhecimento do erro e de seu reparo (HALVARSSON et al. 2006). Na falta de PMS2, a proteína MLH3 é a candidata para formar o heterodímero com MLH1. Assim, indivíduos podem ser selecionados para a análise de mutação conhecendo-se qual gene deverá ser testado primeiro.

Dado que as proteínas do Sistema de Reparo atuam no núcleo das células reparando o DNA, a marcação apresentada pela técnica de imunoistoquímica utilizando anticorpos contra tais proteínas apresenta padrão de coloração nuclear. Dessa maneira, as células tumorais que apresentem coloração citoplasmática ao invés de nuclear, ou ainda, ausência ou redução de coloração nuclear na presença de células não-neoplásicas com coloração nuclear, devem ser consideradas como apresentando um padrão anormal de coloração, de forma que o resultado deve ser interpretado como inconclusivo.

1.4 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

O DNA humano é formado por regiões codificantes, que correspondem a menos de 5% do genoma humano, e por regiões não codificantes, que compreendem cerca de 95% do genoma. Dentre as regiões não codificantes, as sequências repetitivas correspondem a pelo menos 50% ou mais (LANDER et al. 2001). Estas sequências são divididas em repetições dispersas ou satélites, sendo assim chamadas devido ao aparecimento, na espectrometria ótica, de uma banda “anexa”, ou “satélite”, junto à banda principal (ALBERTS et al. 1999; BAUDHUIN et al. 2005). Os satélites são classificados de acordo com a extensão da sequência repetitiva.

Os microssatélites pertencem a uma classe das mais abundantes de sequências repetitivas intergênicas do genoma eucariótico, e contém repetições de motivos de 1 a 5 pares de bases, podendo chegar a ter até 200 pares de base de extensão total (ALBERTS et al. 1999). São chamados de mononucleotídeos para repetições de mesma base, como por exemplo, repetições de poliadeninas; dinucleotídeos para repetições de duas bases, como por exemplo, de citosina/adenina (CA); e assim por diante até o agrupamento de seis bases. Em relação a frequência, a repetição dinucleotídica de CA são as mais comuns, totalizando 0,5% do genoma; as repetições mononucleotídicas A e T representam 0,3% e as repetições dinucleotídicas GT ou AG representam 0,2%. As repetições mononucleotídicas de C ou de G são raras e as dinucleotídicas CG são mais propensas a metilação e subsequente desaminação, resultando em TG, ou em CA na fita oposta (FERNANDES 2007). Apesar de serem altamente polimórficos nas populações humanas, eles permanecem

estáveis dentro do pouco tempo relativo que é o tempo de vida de um indivíduo (SAKURAI et al. 2007).

Os microssatélites são úteis como marcadores moleculares devido a sua vasta presença no genoma, caracterização por PCR, padrão de herança mendeliana co-dominante e seu polimorfismo extremo, mas sua origem e função ainda não estão claras. Eles têm sido muito importantes em delineação de linhagens celulares, clonagem posicional, e muitas outras implicações em medicina forense. Qualquer expansão ou redução anômala das repetições devido à instabilidade de microssatélites resulta em bandas extras (BLANES e DIAZ-CANO 2006).

Seqüências repetitivas compostas de pequenas unidades como os microssatélites, são particularmente propensas a sofrerem deslizamentos de DNA polimerases por desalinhamento da dupla fita durante a replicação, resultando freqüentemente em desalinhamentos das fitas de DNA. Se não forem reparadas, estes erros se fixam como mutações, através de inserções ou deleções de um ou mais repetições durante as replicações subseqüentes (IMAI e YAMAMOTO 2008).

As proteínas produzidas a partir dos genes do Sistema de Reparo do DNA exercem sua função de forma contínua, preservando a integridade do genoma. A observação de alterações nas seqüências de microssatélites, em um determinado tecido tumoral, demonstra ausência de função normal no reparo do DNA.

Diante da observação de que o DNA extraído de células de alguns tumores apresentava alterações no número de bases repetidas, em um ou mais microssatélites, comparado aos mesmos microssatélites existentes em amostras de DNA de um tecido normal do mesmo indivíduo, esta alteração foi denominada instabilidade de microssatélites (MSI). A MSI foi descrita pela primeira vez em 1993, na Síndrome

de Lynch, levando a uma via alternativa de tumorigênese (PELTOMÄKI et al. 1993).

Assim, o fenótipo MSI, no qual as células acumulam alterações no comprimento das repetições dos microssatélites, é utilizado por refletir a deficiência do Sistema de Reparo do DNA em corrigir erros que ocorrem durante a replicação do DNA (SAKURAI et al. 2007). Assim, tumores da via MSI acumulam mutações que resultam em ativação ou inativação de genes relacionados ao câncer, tanto com papel negativo quanto positivo no crescimento e sobrevivência celular, os quais conduzem aos múltiplos passos da carcinogênese (IMAI e YAMAMOTO 2008).

A perda de atividade das proteínas de reparo acelera significativamente a taxa de acumulação de mutações em genes responsáveis por restringir o crescimento celular, o que fornece uma hipótese razoável para o rápido crescimento dos adenomas e a transição para carcinoma, visto na síndrome de Lynch (BOLAND et al. 2008).

A MSI em genes alvo freqüentemente leva a mutações *frameshift* e inativação da função das proteínas afetadas, provendo assim, uma vantagem seletiva de crescimento para as células com o sistema de reparo deficiente. Já foram relatados 32 genes alvo no genoma humano que possuem repetições mononucleotídicas nas suas regiões codificantes (BOLAND et al. 2008). Como exemplos, os genes *β -catenina*, *TCF-4*, *caspase-5*, *PTEN*, *E2F4*, *MSH3*, *MSH6* e o receptor *insulin-like growth factor II* mostram seqüências repetitivas em suas regiões codificantes (FISHEL 2001; PLASCHKE et al. 2002; BAUDHUIN et al. 2005). O receptor *TGF β II* (*transforming growth factor β receptor II*) e o gene pró-apoptótico *BAX* são freqüentemente inativados por mutações nos tratos mononucleotídicos presentes nas suas regiões codificadoras. Estes achados são considerados como a ligação causal entre MSI e

mutações em genes relacionados ao câncer e são também exemplos persuasivos de diferenças entre as vias de mutação e de supressão para o câncer. Regiões não codificantes também possuem papel na MSI. Estudos mostram a relação de repetições em introns dos genes *ATM* e *hMRE11* e na região promotora do gene *MMP-3* (*matrix metalloproteinase-3*) com a tumorigênese de MSI (IMAI e YAMAMOTO 2008).

Os microssatélites podem ainda ser reconhecidos por fatores de transcrição ou afetar a estrutura da cromatina e conseqüentemente, a conformação do DNA (FERNANDES 2007).

Dessa maneira, é como se as células tumorais apresentassem “impressões digitais” defeituosas em seu DNA tumoral, quando comparadas aos tecidos normais do organismo do mesmo indivíduo (PINHO et al. 2005).

A MSI pode ser analisada comparando o padrão eletroforético do DNA do tumor com o padrão do DNA do tecido colônico normal, amplificados por PCR. A classificação é feita de acordo com a frequência de instabilidade dos marcadores, sendo considerada estável quando nenhum marcador se apresentar instável (MSS), alta quando mais de 30% dos marcadores forem instáveis (MSI-H) e baixa quando menos de 30% dos marcadores forem instáveis (MSI-L), seguindo a sugestão do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos – NCI (*National Cancer Institute*), dentre o painel proposto de 5 marcadores: dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250) (BOLAND et al. 1998; JENKINS et al. 2007).

Existe ainda a sugestão de classificar o fenótipo MSI qualitativamente em dois subgrupos, o Tipo A e o Tipo B, de acordo com o modelo de mudança no

comprimento dos microssatélites dinucleotídicos. O Tipo A seria definido como mudanças no comprimento ≤ 6 pb e o Tipo B como mudanças mais drásticas, ≥ 8 pb. Em tumores colorretais a MSI Tipo B tende a ocorrer na maioria dos marcadores analisados, enquanto que o Tipo A tem a tendência de ser mais notado em um número limitado de marcadores. Desta maneira, os tipos A e B podem corresponder a MSI-L ou -H, respectivamente. Os autores mostraram que todos os tumores do Tipo B foram categorizados em MSI-H e todos os tumores MSI-L exibiram instabilidade do Tipo A (SAKURAI et al. 2007).

O diagnóstico de MSI é realizado verificando-se características de microssatélites no tecido tumoral. Após a extração de DNA, é feita sua amplificação por PCR, e, em seguida, a extensão de um ou mais microssatélites é verificada por eletroforese.

Assim, existem atualmente três razões principais para se testar MSI: é uma ferramenta de rastreamento de pacientes com Síndrome de Lynch, é um marcador prognóstico e pode ser um preditor de processos terapêuticos e de seguimento (HANSEN et al. 2006).

1.5 Proteínas de Reparo do DNA

O sistema de reparo do DNA consiste em várias proteínas nucleares que agem em conjunto para detectar e reparar erros que ocorrem durante a fase S da replicação do DNA. O reparo dos erros de replicação é necessário para a transição da fase S para a G2 para a mitose.

Os elementos críticos para o sistema de reparo mais relevantes na síndrome de Lynch são as famílias de proteínas homólogas ao MutS (MSH) e homólogas ao MutL (MLH). As proteínas agem em heterodímeros, onde a proteína MSH2 é a peça obrigatória do sistema, que dimeriza com dois outros membros da família, MSH6 e MSH3 através de uma ligação por um ADP em uma configuração aberta. O heterodímero MSH2-MSH6 (MutS α) monitora, reconhece e se liga preferencialmente a erros de base simples, como um pareamento G-T ou A-C, ou em repetições mononucleotídicas. Ao reconhecer um erro, através de um processo que consome energia, os complexos MutS α livres interagem com a fita de DNA sintetizada no local do erro, ocorre a troca de ADP para ATP no dímero de forma a fechar sua configuração, e então ele forma um “grampo” deslizando ao redor do DNA, abraçando-o. Alternativamente, o heterodímero MSH2-MSH3 (MutS β) reconhece preferencialmente erros grandes de loops, que podem ocorrer nas repetições dinucleotídicas ou outras sequências repetitivas (BOLAND et al. 2008).

O complexo MutS sinalizam o lugar do reparo, entretanto, para o processo completo, proteínas adicionais são necessárias. A família de proteínas MutL consiste na peça obrigatória, o MLH1, que dimeriza com as proteínas PMS2, PMS1 e também MLH3. Pouco se sabe sobre a família MutL além da função do heterodímero MLH1-

PMS2, que é chamado de MutL α . Este heterodímero possui atividade de endonuclease, interage com o complexo MutS-DNA e juntos, com a ExoI, PCNA e outras enzimas necessárias à síntese do DNA, destroem a nova fita no local do erro e re-sintetizam a fita de DNA.

Na presença de mutação germinativa em MSH2 a ausência da respectiva proteína é usualmente vista em conjunto com a ausência de expressão de MSH6. Isto porque a maioria das mutações em MSH2 criam *stop códons* prematuros, alteram os sítios de *splicing*, ou são grandes deleções ou rearranjos no gene, o que provoca a total ausência de expressão protéica. Deleções nos exons 1 a 6 são particularmente comuns, e as grandes deleções podem chegar a até 1/3 das mutações germinativas em MSH2 (BOLAND et al. 2008).

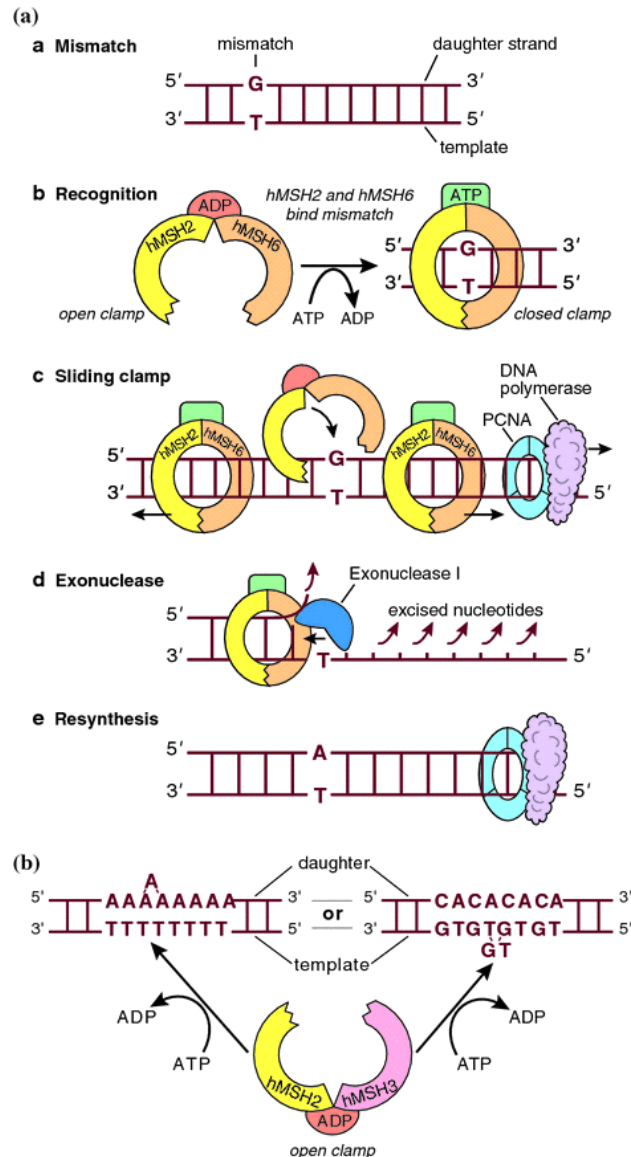
A síndrome de Lynch causada por mutações em MLH1 é mais complicada. Na maioria dos casos de perda de expressão de MLH1 por uma deleção ou um stop códon prematuro ocorre também a perda de expressão de PMS2 na imunoistoquímica. Entretanto, a frequência de mutações *missense* é mais alta do que em MSH2. Algumas destas mutações levarão à perda de atividade enzimática de MLH1, mas as expressões protéicas de MLH1 e PMS2 podem ser preservadas, de forma a provocar uma leitura falsamente “negativa”. Um cenário comum é o de encontrar marcação fraca ou ambígua para MLH1 com ausência de marcação para PMS2, o que parece ser mais representativo de uma mutação *missense* em MLH1. As mutações *missense* que possuem maiores possibilidades de serem patogênicas são as localizadas em domínios de interação entre MLH1 e PMS2 ou ExoI, ou entre os heterodímeros MutS e MutL (BOLAND et al. 2008).

O uso de imunohistoquímica para PMS2 pode ser útil nos casos inconclusivos da síndrome de Lynch “tipo MLH1”, já que, nos casos em que houver ambigüidade de interpretação da expressão de MLH1, a perda de expressão em PMS2 é útil para confirma o achado. Como a proteína MLH1 é expressa em menor abundância do que a MSH2, é preciso experiência na interpretação das lâminas. Além disso, a expressão das proteínas de reparo é suprimida em resposta ao estresse oxidativo e hipóxia, o que também podem ser fatores de confusão (BOLAND et al. 2008).

A síndrome de Lynch causada por mutações em *MSH6* produz fenótipo atenuado, por causa da compensação parcial fornecida pela proteína MSH3. Os tumores nestes casos tendem a ocorrer em idades mais tardias e com freqüente desenvolvimento de câncer de endométrio em mulheres aos 70 anos (71%). Da mesma forma como com MLH1, mutações *missense* em MSH6 aumentam o risco, mas os tumores continuam a apresentar expressão protéica de MSH6 na imunohistoquímica (BOLAND et al. 2008).

A síndrome de Lynch causada por mutações em PMS2 é a forma mais desafiadora da doença devido a existência de um grande número de pseudogenes. Estas mutações levam a um fenótipo atenuado com fraca história familiar e idades mais avançadas de acometimento. Entretanto, existe uma sugestão de que mutações em *PMS2* seriam tão comuns quanto em *MSH2*. Os tumores “tipo PMS2” mostram MSI e isolada perda de expressão de PMS2 em imunohistoquímica. O desafio diagnóstico é distinguir esta doença de certas mutações *missense* em *MLH1* que levam a desestabilização e isolamento da proteína PMS2 (BOLAND et al. 2008).

A Figura 1 a seguir mostra como funciona o sistema de reparo do DNA.



Legenda: A- A polimerase parou erroneamente uma base G na fita-filha de acordo com um T não-complementar da fita molde criando um mal-pareamento. B- O heterodímero hMSH2/hMSH6 (MutS α) se liga ao ADP e em uma configuração aberta monitora a fita de DNA recém sintetizada a procura de erros de pareamento. Uma vez encontrado o erro G-T, ocorre a mudança de ATP por ADP, e a configuração do MutS α é fechada, formando um grampo em torno do DNA. C- O grampo formado pode migrar em qualquer direção do erro, e conforme esta ação ocorre, MutS α adicionais podem ser recrutados ao local do erro. O MutS α se movimentando na direção 5'-3' eventualmente encontra um complexo PCNA-DNApolimerase, e de acordo com uma hipótese, desaloja as enzimas envolvidas na síntese do DNA. D- A exonuclease I, juntamente com o MutL, recorta a fita-filha recém sintetizada voltando ao local do erro, removendo a base mal-pareada. E- O erro é corrigido por re-síntese. (B) Reconhecimento de erros de inserção/deleção de sequências pelo MutS β . Lesões na forma de loops são causadas pelo deslizamento de sequências repetitivas durante a replicação do DNA, e são reconhecidas pelo heterodímero hMSH2/hMSH3 (MutS β). Nesta ilustração o deslizamento criou um pequeno loop na fita nascente de DNA, o que poderia levar a uma mutação por alteração no código de leitura dada a inserção ou deleção de bases após a replicação.

Fonte: BOLAND et al. (2008).

Figura 1 - Sistema de reparo do DNA. (A) Reparo de um erro de nucleotídeo simples na fase S pelo MutS α .

2 OBJETIVO

A síndrome de Lynch é uma das síndromes hereditárias mais comuns na espécie humana. Assim sendo, é fundamental que famílias e/ou pacientes sob risco realizem programas de rastreamento e protocolos de manejo, visando à prevenção do câncer. As técnicas utilizadas para o diagnóstico molecular são caras e trabalhosas, desta forma, torna-se importante a identificação de métodos de rastreamento com boa relação custo-benefício.

Diante disso, este estudo tem os seguintes objetivos:

- Analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 em adenocarcinomas colorretais de pacientes não relacionados, com critérios clínicos para suspeita de síndrome de Lynch (Amsterdam I/II ou Bethesda);
- Analisar MSI nos adenocarcinomas colorretais, utilizando um painel de 10 marcadores, no mesmo grupo de pacientes;
- Correlacionar os resultados com dados clínicos, anatomopatológicos, e de antecedentes familiares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

3.1.1 Aspectos Éticos

O estudo foi conduzido de acordo com a Resolução 196/96 que regulamenta a pesquisa em seres humanos; e a resolução 340/04 que regulamenta a pesquisa em genética humana. Todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os resultados dos testes serão confidenciais divulgados apenas ao paciente, se assim desejar. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital AC Camargo e obteve parecer favorável em 30 de maio de 2006 sob todos os aspectos analisados sendo, portanto, aprovado com a identificação 796/06.

3.1.2 Convocação dos Pacientes

Os pacientes selecionados foram convidados a participarem do estudo através de carta-convite. Os participantes compareceram ao Hospital AC Camargo para consulta de aconselhamento genético, que teve duração média de 1 hora e 30 minutos, para a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1.3 Inclusão de Instituições

Devido ao fato de que o presente projeto de mestrado faz parte do estudo “Avaliação da Frequência de Mutações nos Genes de Reparo de DNA em Pacientes

com Suspeita de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose: Estudo Colaborativo Sul-Americano”, aprovado pela FAPESP em 20 de abril de 2006, com registro número 2005/05155-6 e pelo CEP do Hospital AC Camargo com registro número 781/06, os centros estrangeiros participantes *Hospital de Las Fuerzas Armadas* (Montevideo, Uruguai) e Hospital Italiano (Buenos Aires, Argentina) também foram incluídos nas análises. As amostras tumorais foram enviadas, revisadas e analisadas no Hospital AC Camargo.

3.1.4 Seleção dos Pacientes

Os pacientes do Hospital AC Camargo, com heredograma cadastrado no Registro de Câncer Colorretal Hereditário foram selecionados com base no preenchimento dos critérios de Amsterdam I/II, Bethesda ou CCF. Até o mês de maio de 2008 foram registradas 64 famílias Amsterdam, 125 famílias Bethesda e 40 famílias CCF. Os dados foram revistos nos prontuários individuais e familiares, foi realizada a revisão de lâminas de cada caso para confirmação do diagnóstico juntamente com o patologista e verificada a disponibilidade de material biológico (tecido normal e tumoral).

Dentre os pacientes cadastrados no registro de câncer colorretal hereditário 85 pacientes possuíam peça de tumor colorretal identificada e revisada, pacientes que foram efetivamente incluídos no estudo, dentro da Instituição. Além destes, 10 pacientes que fizeram acompanhamento posterior na Instituição e que, quando convocados para o estudo se dispuseram a solicitar os blocos do local de tratamento anterior, também foram incluídos no estudo.

Dessa maneira, foram incluídos no projeto 95 pacientes do Registro de Câncer Colorretal Hereditário, Departamento de Cirurgia Pélvica, Hospital AC Camargo – São Paulo, Brasil, que fizeram ou fazem o acompanhamento na Instituição, 12 pacientes enviados pelo Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina (apenas adenocarcinomas) e 3 pacientes (1 adenoma e 2 adenocarcinomas) pelo *Hospital Central de las Fuerzas Armadas*, Montevideo, Uruguai. Destes, as análises imunoistoquímicas foram realizadas em todos os 95 pacientes da instituição e nos 15 pacientes estrangeiros. Já as análises de MSI foram realizadas em 26 pacientes dentre os 95 estudados provenientes da Instituição.

3.1.5 Dados Clínicos

Foram levantados os dados clínicos dos pacientes que possuíam relevância com os resultados dos testes que foram realizados para as futuras correlações com os achados. De acordo com dados já descritos na literatura foram incluídos na ficha os seguintes itens: classificação segundo história familiar, sexo, tumores diagnosticados, localização do tumor colorretal, estadiamento TNM, presença de metástase, grau de diferenciação do tumor, presença de embolização vascular sanguínea ou linfática, invasão perineural, tipo histológico.

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

3.2.1 Anticorpos

A análise imunoistoquímica das proteínas de reparo em cortes parafinados foi realizada utilizando-se os seguintes anticorpos:

1. MLH1 – clone 168-728 – BD PharMingen – diluição 1/600
2. MSH2 – clone FE11 – BD Calbiochem – diluição 1/1000
3. MSH6 – clone 44 – BD PharMingen – diluição 1/40
4. PMS2 – clone A16-4 - BD PharMingen – diluição 1/500

3.2.2 Protocolo para material em parafina

Os cortes histológicos presentes nas lâminas foram submetidos ao seguinte protocolo para todos os anticorpos:

- 1) Desparafinização:
 - a) 3 banhos em xilol por 5 minutos
 - b) 4 banhos rápidos de etanol 100%
 - c) lavar em água corrente por 5 minutos
- 2) Recuperação antigênica
 - a) **MLH1, MSH2 e MSH6**
 - Panela de Pressão e Tampão citrato pH 6,0
 - a. colocar lâminas na cuba de plástico e adicionar tampão até cobri-las
 - b. colocar 1500 ml de água destilada na panela
 - c. Programar a panela para 25 minutos ou quando começar a pressão deixar por 15 minutos
 - d. Desligar a panela (depois que acabar a pressão), retirar a cuba e esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente
 - b) **PMS2**
 - Banho-maria e Tampão EDTA + Tris pH 9,0
 - a. Banho Maria e tampão a 96°C
 - b. Colocar as lâminas na cuba (redondas de plástico)
 - c. Incubar no banho por 40 minutos
 - d. Esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente

- após a recuperação, lavar em água corrente por 5 minutos. Secar as lâminas rapidamente com papel filtro e circular os cortes com caneta de silicone.

3) Bloqueio da peroxidase endógena

- a. incubar as amostras em H_2O_2 10 volumes (peróxido de hidrogênio 3%) por 3 vezes durante 5 minutos
- b. lavar em água corrente por 5 minutos

4) Bloqueio de proteínas inespecíficas (para evitar ou reduzir o background)

- a. adicionar 100 µl da solução Protein Block Serum-Free (Dako, Califórnia, Estados Unidos)
- b. incubar por 20 minutos em câmara úmida
- c. retirar solução

5) Incubação com anticorpo primário

- a. diluir o anticorpo com *Antibody Diluent with Background Reducing Component* (Dako). Se o intervalo entre a diluição e o uso for longo, cobrir com papel alumínio e deixar na geladeira
- b. adicionar 100 µl do anticorpo diluído sobre o corte
- c. incubar por 2 horas em câmara úmida
- d. lavar cada lâmina separadamente com PBS 1X
- e. lavar as lâminas em PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos

6) Amplificação (sistema polímero) - NovoLink Max Polymer (Novocastra, UK)

- a. adicionar 100 µl de *Post Primary Block Novolink*
- b. incubar por 30 minutos em câmara úmida
- c. lavar cada lâmina separadamente com PBS 1X
- d. lavar as lâminas separadamente com PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos
- e. adicionar 100 µl de Polymer Novolink
- f. incubar por 30 minutos em câmara úmida
- g. lavar cada lâmina separadamente com PBS 1X
- h. lavar as lâminas em PBS 1X por 3 vezes durante 5 minutos

7) Coloração - DAB (*diaminobenzidine tetrahydrochloride*)

- d. diluir DAB 1:50 - *Liquid DAB + Substrate Chromogen System* (Dako, Califórnia, Estados Unidos)
- a. adicionar 100 µl de DAB nas lâminas por até 5 minutos, observando a coloração marron
- b. retirar o excesso de DAB em água destilada
- c. lavar em água corrente por 5 minutos
- d. incubar em Hematoxilina de Harris (Merek) por 1 minuto para contra-coloração
- e. lavar em água corrente para retirar o excesso de hematoxilina
- f. passar rapidamente pelo Diferenciador (etanol + HCl)
- g. lavar em água corrente por 5 minutos

8) Montagem das lâminas

- a. 4 banhos rápidos em etanol 100%
- b. banho rápido em etanol 100%+xilol
- c. 3 banhos rápidos em xilol
- d. pingar Entelan (Merck) na lamínula e colocar a lâmina
- e. limpar lâmina com xilol

3.2.3 Protocolo para material congelado

1) Fixação

- a. fixar o corte em paraformaldeído 2-4% imediatamente após o corte ou retirada do freezer
- b. aguardar 5 minutos
- c. realizar 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS + Tween 1%
- d. lavar em água corrente por 5 minutos
- e. lavar uma vez com água destilada

- prosseguir a partir do item 4 do protocolo para material em parafina descrito acima (bloqueio de proteínas inespecíficas).

3.2.4 Soluções para Imunoistoquímica

- 1) Tampão citrato 10 mM pH 6,0
 - a. 12,6 g de ácido cítrico
 - b. água destilada q.s.p. 6,0 L
 - c. corrigir o pH com NaOH 2N

- 2) Tampão Tris-EDTA pH 9,0
 - a. 0,372 g de EDTA
 - b. 1,21 g de Tris
 - c. água destilada q.s.p. 1,0 L
 - d. corrigir o pH com NaOH 2N

- 3) Tampão PBS 0,01 M pH 7,4 20X (concentrado)
 - a. 160 g de NaCl
 - b. 27,31 g de fosfato de sódio dibásico
 - c. 4,86 g de fosfato de sódio monobásico
 - d. água destilada q.s.p. 1,0 L

- 4) Diferenciador
 - a. 500 ml de etanol 50%
 - b. 27 gotas de HCl

- 5) Água DEPC 0,02%
 - a. em 1 litro de água destilada, colocar 200 µl de DEPC (dietilpirocarbonato)
 - b. agitar por 2 horas, até dissolver o DEPC
 - c. esterilizar em autoclave

- 6) Parafolmoldeído em PBS
 - a. preparar PBS com 700 ml de água DEPC com:
4 g de fosfato de sódio monobásico
6,5 g de fosfato de sódio dibásico
 - b. agitar e aquecer a solução a 60°C

- c. após diluída a solução, acrescentar:
40 g de paraformaldeído (PFA – SIGMA P-6148)
- d. agitar a 60°C até dissolver
- e. ajustar o pH a 7,2-7,4 com HCl ou NaOH
- f. acrescentar água DEPC até completar 1 litro

3.2.5 Classificação Histológica

O adenocarcinoma colorretal leva em consideração a extensão da aparência glandular do tumor que é dividida em bem diferenciado, quando este exibe mais de 95% de estruturas glandulares; moderadamente diferenciado, quando exibe de 50% a 95% de estruturas glandulares; pouco diferenciado quando apresenta de 5% a 50% de estruturas glandulares; e os indiferenciados, que apresentam menos que 5% de estruturas glandulares (classificação da OMS) (REDSTON 2004).

Na classificação histológica utilizada, que segue a OMS e internacionalmente aceita, os tumores que apresentam glândulas e aspectos tubulares foram designados como adenocarcinoma tubular; aqueles que apresentam mais que 50% de mucina extracelular foram designados como adenocarcinoma mucinoso; e aqueles que apresentam entre 10 e 50% de mucina como adenocarcinoma com diferenciação mucinosa (REDSTON 2004). Os adenocarcinomas mucinosos e os adenocarcinomas com diferenciação mucinosa foram agrupados para as análises.

Os adenocarcinomas que demonstram células com mucina intracelular em mais que 50% do tumor foram designados como adenocarcinomas em anel de sinete. E os carcinomas medulares, que é um subtipo de adenocarcinoma apenas recentemente reconhecido pelo OMS, foram designados quando apresentavam de tumores sólidos, com células poligonais, com núcleo vesicular e marcado infiltrado tumoral linfocítico (REDSTON 2004).

O termo *budding* denota que na frente de invasão das células tumorais dos adenocarcinomas colorretais, células epiteliais neoplásicas isoladas ou em pequenos agregados se apresentam destacadas das glândulas neoplásicas, migrando em direção ao estroma desmoplásico. A classificação “*budding*” é realizada para grupos de até cinco células tumorais. Esta característica morfológica tem sido amplamente reconhecida como um fator forte e robusto de prognóstico adverso, pois tem sido considerado como uma fase inicial de invasão do tumor, associado tanto com atividade metastática quanto com prognóstico (SOHN et al. 2007).

A migração celular tumoral ocorre como um componente da desdiferenciação observada na margem invasiva. Tais células apresentam protrusões citoplasmáticas em contato direto com o tecido intersticial adjacente, como “pés”, que são formados durante a migração celular, resultado da re-organização do citoesqueleto após a redução de contato célula-célula e célula-matriz extracelular (PRALL 2007).

A maioria dos adenocarcinomas colorretais da síndrome de Lynch não apresentam *budding*. A explicação consiste no fato de que os adenocarcinomas da síndrome apresentam sistema de reparo do DNA deficiente. Assim, mutações que inativam alguns dos genes-chave para desencadear a migração celular podem evitar a formação de *buddings*. Como exemplo, o gene *TGFβRII* contém uma repetição de adeninas na sua região codificante, podendo ser, portanto, alvo freqüente de mutações que não são reparadas pelo sistema deficiente de reparo do DNA. Assim, a falta da sinalização desencadeada pelo *TGFβRII* pode ser a explicação pela baixa freqüência de *budding* nos adenocarcinomas da síndrome de Lynch (PRALL 2007).

3.3 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

3.3.1 Marcadores

A pesquisadora e co-orientadora deste projeto Renata de Almeida Coudry viajou como professora visitante a *Mayo Clinic* (Rochester, Estados Unidos) e ao *Fox Chase Cancer Center* (Philadelphia, Estados Unidos), no período de 09 de abril até 30 de maio de 2007 para padronização da técnica de Instabilidade de Microssatélites.

De acordo com a visita e treinamento da Dra. Renata Coudry, optou-se por seguir o protocolo e a metodologia aplicados rotineiramente no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Laboratório Médico e Patologia da *Mayo Clinic*. Desta maneira, serão avaliados ao invés de sete, 10 marcadores de MSI, quatro mononucleotídicos (BAT25, BAT26, BAT34c4 e BAT40), cinco dinucleotídicos (D10S197, D17S250, D18S55, D5S246 e ACTC) e um de composição variável, sendo mononucleotídico flanqueado por repetições tetra ou pentanucleotídicas (MYCL), através de uma reação de PCR fluorescente.

Os oligonucleotídeos dos marcadores analisados foram confeccionados pela empresa ABI de acordo com a sequência de bases da Tabela 5.

Tabela 5 – Sequência de primers de MSI.

BAT-26-F: 5`-(6-FAM)-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3`
BAT-26-R: 5`-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3`
BAT-40-F: 5`-(6-FAM)-ATTAACCTTCCTACACCACAAC-3`
BAT-40-R: 5`-GTAGAGCAAGACCACCTTG-3`
D10S197-F: 5`-(6-FAM)-ACCACTGCACTTCAGGTGAC-3`
D10S197-R: 5`-GTGTCTTGTGATACTGTCCTCAGGTCTCC-3`
D17S250-F: 5`-(6-FAM)-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3`
D17S250-R: 5`-GTGTCTTGCTGGCCATATATATATTTAAACC-3`
BAT-34c4-F: 5`-(VIC)-ACCCTGGAGGATTTTCATCTC-3`
BAT-34c4-R: 5`-AACAAAGCGAGACCCAGTCT-3`
BAT-25-F: 5`-(NED)-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3`
BAT-25-R: 5`-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3`
D18S55-F: 5`-(NED)-GGGAAGTCAAATGCAAAATC-3`
D18S55-R: 5`-GTGTCTTAGCTTCTGAGTAATCTTATGCTGTG-3`
D5S346-F: 5`-(VIC)-ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG-3`
D5S346-R: 5`-GTGTCTTAGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT-3`
ACTC-F: 5`-(NED)-TTCCATACCTGGGAACGAGT-3`
ACTC-R: 5`-GTGTCTTTTGACCTGAATGCACTGTGA-3`
MYCL-F: 5`-(VIC)-TGGCGAGACTCCATCAAAG-3`
MYCL-R: 5`-GTGTCTTCCTTTTAAAGCTGCAACAATTTC-3`

Os pares de primers confeccionados pela *Applied Biosystems* (Califórnia, Estados Unidos) chegaram liofilizados contendo 80.000 pmol. Com estes foram confeccionadas soluções estoque de 100 pmol/ μ l adicionando 800 μ l de água Sigma em cada tubo. A solução de trabalho foi diluída a 10 pmol/ μ l.

A solução estoque foi testada quanto a sua integridade através de uma eletroforese em gel de acrilamida a 12% e 80 mV. Todos os primers apresentavam-se sem degradação.

O composto fluorescente 6-FAM apresenta coloração azul, o VIC apresenta coloração verde e o NED apresenta coloração amarela. Por serem sensíveis a luminosidade, tais compostos foram manuseados protegendo-os da luz. Um controle normal e controle sem DNA foram utilizados em cada análise. As reações de PCR

foram realizadas de acordo com o seguinte programa de ciclagem: Ativação da Taq-Gold a 95°C por 12 minutos. Denaturação a 95°C por 30 segundos. Anelamento a 55°C por 30 segundos. Extensão a 72°C por 30 segundos. Número de ciclos = 35. Extensão final a 72°C por 10 minutos. Armazenamento a 5°C.

Os produtos de PCR foram submetidos à análise no equipamento ABI PRISM 3130 *Automated Genetic Analyser*, utilizando o software GeneMapper (*Applied Biosystems*, Califórnia, Estados Unidos). Ao produto de PCR diluído é adicionado formamida e um marcador de peso molecular, seguindo o seguinte protocolo:

- 1- Fazer um mix de formamida Hi-DiTM com o marcador de peso molecular (*GeneScan Size Standard 600Liz®*) respeitando a proporção de 11,5 µl de formamida e 0,5 µl de Size Standard para cada amostra. Adicionar 12 µl do mix em cada poço da placa.
- 2- Adicionar 1 µl de produto de PCR (concentrado ou diluído) por poço da placa de 96 poços já contendo o mix de formamida e marcador. Centrifugar rapidamente.
- 3- Colocar a placa em termociclador para denaturar as amostras por 2 minutos a 95°C e logo a seguir colocar em gelo por 3 minutos.
- 4- Colocar a placa no ABI PRISM 3130 para análise.

A análise é feita comparando-se o eletrofluorograma do tecido normal com o tecido tumoral. A presença de picos de comprimentos diferentes entre as amostras do mesmo paciente demonstram variação no tamanho dos alelos, o que caracteriza a instabilidade daquele marcador estudado.

A classificação foi realizada de acordo com a frequência de instabilidade dos marcadores, sendo considerada alta quando mais de 30% dos marcadores forem instáveis (MSI-H), baixa quando menos de 30% dos marcadores forem instáveis (MSI-L) e estável quando nenhum dos marcadores forem instáveis, seguindo a sugestão do NCI.

A extração de DNA das amostras tumorais emblocadas em parafina seria realizada utilizando o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as orientações do fabricante. O DNA obtido seria quantificado em espectrofotômetro e armazenado a -20°C . Entretanto, muitos problemas ocorreram e não foi possível realizar a análise de instabilidade de microssatélites nas amostras emblocadas em parafina. As dificuldades serão descritas a seguir juntamente com os resultados obtidos.

Dessa maneira, buscando aplicar os conhecimentos adquiridos e realizar uma análise dos dados, ainda que em uma amostra pequena, decidiu-se realizar a técnica de instabilidade de microssatélites em um conjunto de 26 pacientes que dispunha de tecido fresco congelado no Banco de Tumores da Instituição.

3.3.2 Extração de DNA e Amplificação das Amostras do Banco de Tumores

Foram realizados quinze cortes de cinco μm de cada amostra tumoral e dez cortes das amostras de mucosa colônica normal, sendo que uma delas foi corada imediatamente com HE e analisada por um patologista para avaliação da presença de tumor no material e para demarcar a área de tumor a ser raspada, sempre considerando a necessidade de mais de 70% de tumor na amostra para a obtenção de resultados acurados.

O DNA das amostras de tecido fresco do Banco de Tumores foi extraído utilizando-se o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as orientações do fabricante.

Os DNAs extraídos foram quantificados no NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, Estados Unidos). A quantidade obtida de DNA das

amostras apresentou resultados variáveis dependendo do tamanho do tecido, mas sempre com quantidade e qualidade adequadas. Para as reações de PCR todas as amostras foram ajustadas para 20 ng/μl.

3.3.3 Eletroforese

Para a confecção de géis de acrilamida são preparadas as seguintes soluções:

- 1) Acrilamida 29% / Bisacrilamida 1%
 - a. 29 g - acrilamida
 - b. 1 g - bisacrilamida
 - c. 100 ml - H₂O milli-Q
 - d. 1 hora sob agitação
 - e. filtrar com papel filtro
 - f. armazenar em geladeira protegido da luz

- 2) TBE 10X (Tris-Borato-EDTA) pH 8,3
 - a. 108 g - tris base
 - b. 55 g - ácido bórico (H₃BO₃)
 - c. 40 ml - EDTA ½ M pH 8,0
 - d. H₂O milli-Q qsp 1 L
 - e. acertar o pH em 8,3 e autoclavar

- 3) NaOH 3%
 - a. 30 g em 1 L H₂O milli-Q
 - b. armazenar em vidro ou plástico

- 4) Prata (AgNO₃ 0,45%)
 - a. 0,45 g em 100 ml H₂O milli-Q
 - b. armazenar em frasco protegido da luz

- 5) APS 10% (Persulfato de Amônia)

- a. 0,1 g em 1 ml de H₂O milli-Q
 - b. aliquotar e armazenar a -20°C
- 6) Fixador
- a. 100 ml - etanol 100%
 - b. 7,5 ml - ácido acético
 - c. H₂O qsp 1L
- 7) Tampão de Amostra
- a. 0,25% - azul de bromofenol
 - b. 0,25% - xileno cianol
 - c. 30% - glicerol em H₂O ou 15% - ficoll em H₂O
- 8) “Sopa” (total 6 ml)
- a. 1,6 ml - acrilamida/bisacrilamida
 - b. 0,6 ml - TBE 10X
 - c. 3,8 ml - H₂O milli-Q
- 9) Gel
- a. 6 ml - sopa
 - b. 60 µl - APS 10%
 - c. 6 µl – TEMED

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IMUNOISTOQUÍMICA

BAUDHUIN et al. (2005) relatam que os ensaios imunoistoquímicos para as proteínas de reparo do DNA possuem a reputação de serem difíceis de serem realizados e interpretados. GATALICA e TORLAKOVIC (2008) relatam que na avaliação da expressão das proteínas de reparo por imunoistoquímica qualquer expressão nuclear nas células tumorais é considerada positiva, devido à heterogeneidade de expressão e dificuldades de padronização do teste. No entanto, controles internos positivos têm de ser observados, caso contrário, a coloração não será informativa. Outra observação feita pelos pesquisadores foi de que na mucosa normal, a intensidade de coloração nuclear dos enterócitos diminui em direção à superfície. No presente estudo foram conseguidos resultados excelentes para todos os anticorpos analisados.

Um estudo que visava identificar o potencial da imunoistoquímica em identificar corretamente portadores de mutações em *MLH1* e *MSH2* mostrou que a recuperação antigênica é o processo chave no procedimento. Os autores compararam resultados de 20 CCRs enviados a 18 laboratórios para as análises. As conclusões do estudo mostram que além da interferência do processo de fixação e processamento das amostras de cada laboratório, para a recuperação antigênica deve ser utilizado tampão com EDTA ou com citrato. Além disso, o estudo mostrou que a sensibilidade e a especificidade em detectar a ausência de expressão protéica nos casos que

apresentavam mutação germinativa foram significativamente mais baixas para *MLH1* do que para *MSH2*. Os problemas variaram entre coloração muito fraca, falta de controle interno positivo, ou ainda, elevado background. A conclusão do estudo foi de que para estes anticorpos, principalmente no caso de *MLH1*, cada laboratório deve aperfeiçoar tanto a recuperação antigênica quanto os protocolos de colorações, de acordo com a própria rotina de fixação das amostras (MÜLLER et al. 2001).

Devido ao fato de que os achados de pacientes portadores de mutações em *MSH6* e em *PMS2* terem aumentado consideravelmente, variando em frequência de acordo com o estudo, visando melhor e mais completa de caracterização do grupo de pacientes estudado, foi decidido incluir a investigação imunoistoquímica das proteínas *MSH6* e *PMS2* neste estudo.

Estudos mostraram alta sensibilidade em detectar mutações em *MSH2* (92%) e *MSH6* (90%) aplicando a imunoistoquímica nos tumores. A imunoistoquímica para *MLH1* apresentou sensibilidade menor, de 48%, quando foi utilizado apenas anticorpo contra *MLH1*. Entretanto, quando a imunoistoquímica para *PMS2* foi adicionada ao teste, a taxa aumentou de 48% para 71% (HENDRIKS et al. 2006b).

JONG et al. (2004) mostraram que houve concordância na ausência de expressão protéica entre *MLH1* e *PMS2* em 88% dos casos. Do estudo de 1048 carcinomas colorretais, 16 casos (1,5%) apresentaram ausência de expressão protéica de *PMS2* e MSI. Nenhuma das 6 famílias nas quais foram encontradas mutações truncadas preenchiam os critérios de Amsterdam. Entretanto, 5 das 6 famílias preenchiam os critérios de Bethesda (HENDRIKS et al. 2006a). Outro estudo mostrou que resultados concordantes com perda de expressão tanto de *MLH1* quanto de *PMS2* foram encontrados em 98% dos tumores (HALVARSSON et al. 2006).

O padrão de imunistoquímica que mostre ausência de expressão tanto de MSH2 quanto de MSH6 e presença de MLH1 e PMS2 indica mutação em *MSH2* na maioria dos casos e em menor número indica mutação em *MSH6* (HENDRIKS et al. 2006b).

A ausência de expressão de MLH1 e PMS2 com presença de expressão de MSH2 e MSH6 são indicativas de mutação em *MLH1*. Na falta de MLH1 o heterodímero com a proteína PMS2 não é formado, a proteína PMS2 é rapidamente degradada, e ambas as proteínas não apresentarão marcação na imunistoquímica. A ausência de marcação de MLH1 também pode ser causada por hipermetilação da região promotora do gene, um evento somático que se restringe ao tumor e não tem relação com a mutação germinativa em *MLH1* (HENDRIKS et al. 2006b). Mais de 90% dos carcinomas da síndrome de Lynch exibem MSI-H, em contraste com os esporádicos, que corresponde de 10% a 15%, o que usualmente ocorre devido a metilação do promotor de *MLH1* (MÜLLER et al. 2006).

Devido ao fato de que a proteína PMS2 forma um heterodímero com a proteína MLH1, é possível esperar que a falta da proteína MLH1 devido a uma mutação germinativa também levaria a uma perda de expressão da proteína PMS2, causada por uma anulação do complexo protéico normal. Entretanto, os achados de presença protéica de MLH1 com ausência protéica de PMS2 indicam que mais portadores de mutações em *MLH1* podem ser identificados. O que pode explicar este fato é o tipo de mutação que acomete o gene *MLH1*, que seria responsável pelos achados de presença protéica no núcleo, enquanto que a ligação com PMS2 estaria anulada (JONG et al. 2004). Em uma pequena parcela dos casos, combinações não

usuais das proteínas mostram perda de expressão. A origem destas combinações anormais não está totalmente clara (BAUDHUIN et al. 2005).

Se um segundo tumor é facilmente obtido, a imunoistoquímica do segundo tumor deve ser considerada para análise. Tal ação é também recomendada nos casos em que a análise de MSI do primeiro tumor mostrar um fenótipo de marcadores estáveis. Os adenomas também são adequados a análises de imunoistoquímica se eles são grandes, se possuem displasia de alto grau, e se ocorrem em pacientes menores do que 50 anos (HENDRIKS et al. 2006a).

Os anticorpos MSH2 e PMS2 apresentaram-se de forma muito semelhante em quase todas as lâminas realizadas, obedecendo quase que exclusivamente ao protocolo padronizado. Já os anticorpos MLH1 e MSH6 mostraram-se bastante suscetíveis às variações de cada lâmina, provavelmente apresentando interferências devido aos diferentes tempos entre a retirada do espécime até a sua fixação em formalina, e principalmente a idade do bloco. Assim, muitas lâminas necessitaram ser repetidas ajustando melhor as diluições e alternando entre as marcas dos polímeros utilizados, ora NovoLink (Novocastra, Newcastle, Reino Unido), ora Advance HRP (Dako, Califórnia, Estados Unidos), sempre buscando melhores resultados.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum por um único patologista. Os cortes histológicos de neoplasias foram examinados, e considerados perda do gene de reparo quando ocorreu a negatividade nuclear na coloração imunoistoquímica nas áreas tumorais, porém com presença de expressão protéica em mucosa colônica normal adjacente e/ou células do estroma.

Os anticorpos adquiridos foram submetidos aos testes para padronização da reação imunoistoquímica buscando sempre a melhor eficiência. As fotos abaixo representam o melhor resultado atingido da padronização das reações imunoistoquímicas realizadas para os anticorpos estudados em tecidos colônicos normais. Por serem proteínas responsáveis pelo reparo do DNA, quando expressas apresentam marcação nuclear, como verificado da Figura 2.

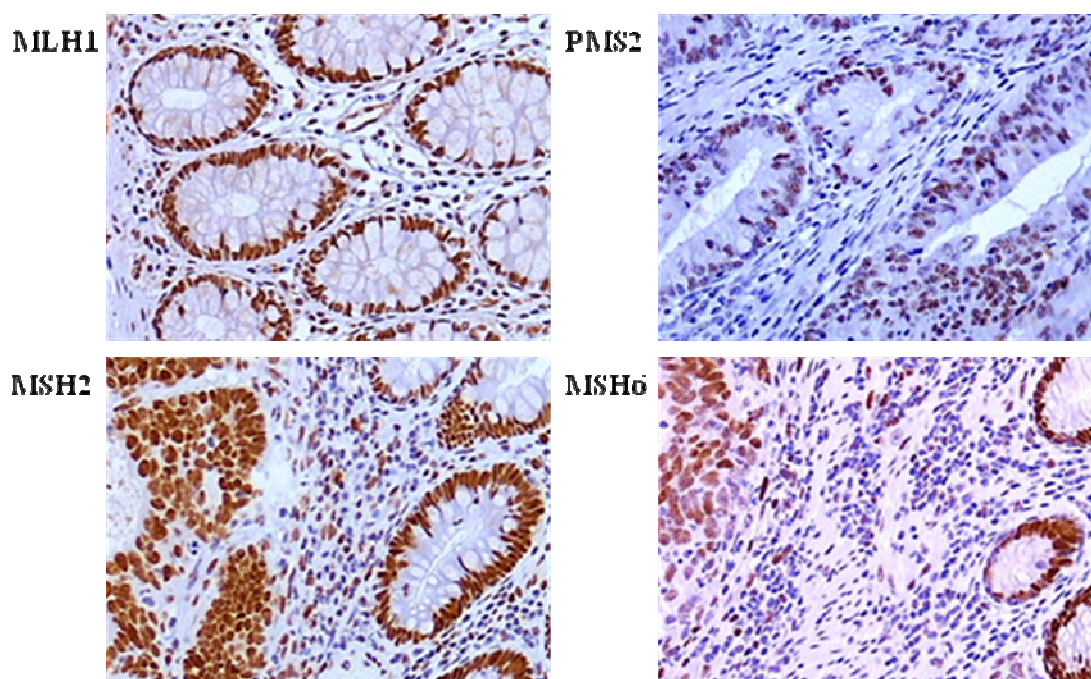
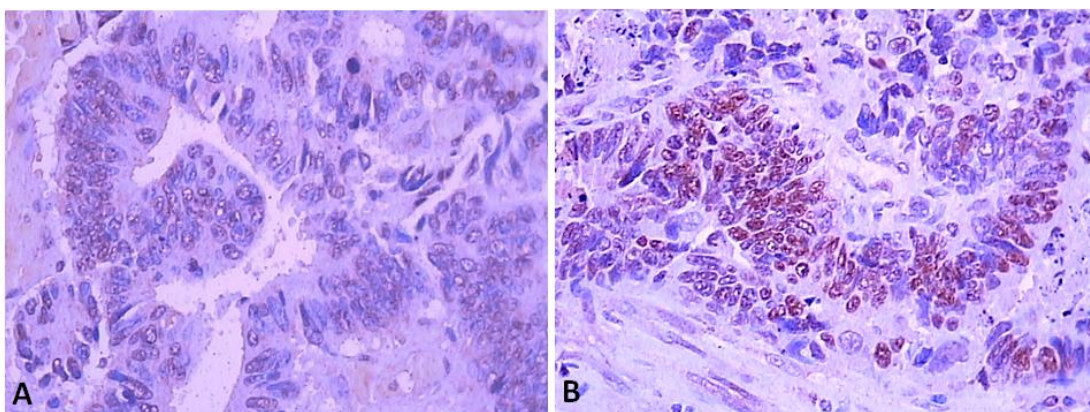


Figura 2 - Fotos de lâminas coradas positivamente para as proteínas dos genes de reparo. Aumentos de 40x.

As padronizações foram realizadas utilizando lâminas de mucosa colônica normal. Entretanto, quando as reações com o anticorpo MSH6 foram iniciadas, os resultados não se mostraram da mesma forma como padronizados no controle. Assim, decidiu-se trocar o anticorpo MSH6 clone 44 - ABCAM (Cambridge, Estados Unidos) pelo clone 44 - BD PharMingen (San Diego, Califórnia), que apresentou

melhores resultados nas lâminas de adenocarcinomas. A comparação entre os resultados dos dois anticorpos é exemplificada em uma lâmina analisada, como referência do padrão apresentado (Figura 3).



Legenda: A: anticorpo MSH6 ABCAM. B: anticorpo MSH6 BD PharMingen.

Figura 3 - Adenocarcinomas colorretais com positividade para a proteína de reparo MSH6.

As reações dos anticorpos MSH2 e PMS2 foram padronizadas e realizadas no equipamento AutoStainer DakoCytomation (Dako, Califórnia, Estados Unidos). As lâminas com resultados conflitantes foram repetidas manualmente. As reações dos anticorpos MLH1 e MSH6 foram realizadas manualmente, pois não apresentaram resultados satisfatórios utilizando o equipamento.

Foram avaliados 110 casos totais, compreendendo 85 pacientes do Hospital AC Camargo, 10 pacientes tratados em outra instituição que trouxeram seus blocos de parafina, 12 pacientes da Argentina e três pacientes do Uruguai.

Dentre os 95 pacientes brasileiros, foi possível analisar apenas o adenoma de 9 pacientes, e de outros 15 pacientes foi possível analisar além do adenocarcinoma, o adenoma também. Dentre os 12 pacientes argentinos, 11 deles possuem peça de

adenocarcinoma e um apenas de adenoma. Dentre os 3 pacientes uruguaios, 1 deles apresentava peça de adenocarcinoma e adenoma.

Os dados relatados a seguir referem-se apenas aos pacientes pertencentes ao Registro de Câncer Colorretal do Hospital AC Camargo cujos dados clínicos foram possíveis de serem recuperados. Sendo assim, os resultados de imunoistoquímica dos pacientes da Argentina e do Uruguai serão discutidos posteriormente, pois não foram enviados os dados clínicos destes. Dos 95 casos analisados, nove deles, apesar de pertencerem às famílias que preenchem os critérios clínicos para o projeto, possuíam apenas adenomas ou não foi possível resgatar a peça do adenocarcinoma do indivíduo analisado. Dessa maneira, o levantamento mostrado a seguir revela números totais diferentes de acordo com o dado analisado.

A Tabela 6 mostra os achados de ausência protéica para pelo menos uma das proteínas de reparo na imunoistoquímica dos 95 pacientes analisados.

Tabela 6 – Avaliação da expressão das proteínas de reparo do DNA.

Expressão protéica	Número	Porcentagem
Presente	65	68,4%
Ausente	30	31,6%

Os resultados mostram que 31,6% dos casos apresentaram uma possível alteração no sistema de reparo do DNA, já que nem todas as proteínas de reparo apresentaram-se expressas. Em se tratando de uma amostra com pacientes que preenchem tanto os critérios de Amsterdam quanto os de Bethesda, o resultado mostrado é condizente com o relatado em literatura. Apenas um caso apresentou resultado inconclusivo após várias repetições para a proteína MSH6, porém como

presença protéica nos demais genes. Tal fato é provavelmente decorrente do processo de fixação do material. Este caso foi considerado nesta tabela como um caso sem alteração na imunoistoquímica.

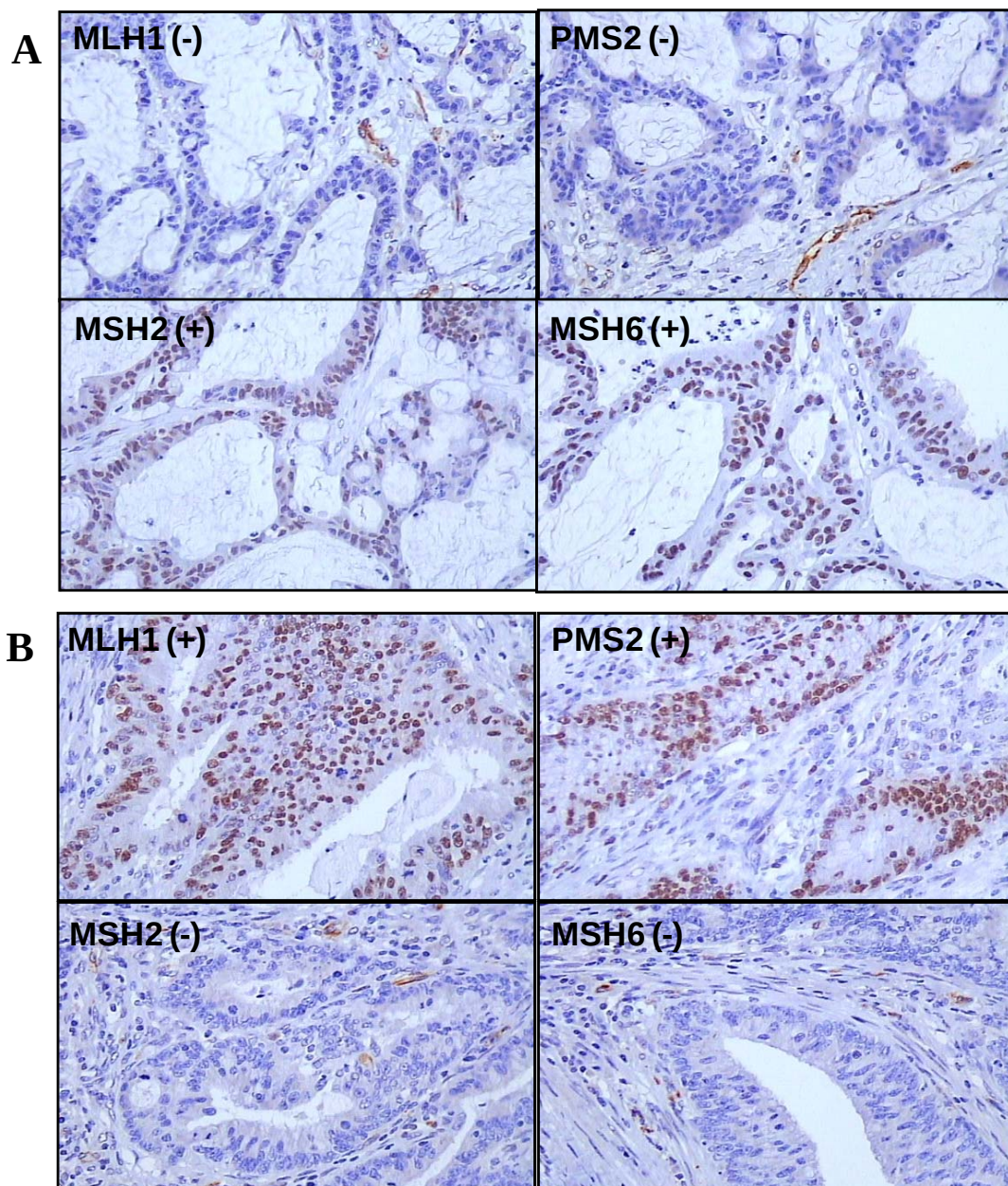
A Tabela 7 mostra os achados de ausência protéica (na tabela relatado como negatividade) para as proteínas de reparo individualmente, ou em dímeros, para os 95 pacientes analisados.

Tabela 7 – Discriminação da expressão protéica por imunoistoquímica em 95 pacientes com suspeita para SL.

Imunoistoquímica	Número	Porcentagem
Positivos	64	67,4%
MLH1/PMS2 negativos	7	7,4%
MSH2/MSH6 negativos	15	15,8%
MLH1 negativo	1	1,1%
PMS2 negativo	6	6,3%
MSH6 negativo	1	1,1%
Inconclusivo	1	1,1%

Dos 95 pacientes analisados, 31,6% deles apresentaram alguma perda de expressão protéica. Diferentemente do que encontrado na literatura, o dímero MSH2/MSH6 apresentou maior frequência de alteração do que o dímero MLH1/PMS2. Este achado evidencia a possível heterogeneidade da população brasileira. Além disso, muitos estudos mostram uma alta sensibilidade em prever mutações em *MSH2* (92%) através da imunoistoquímica, porém baixa sensibilidade para *MLH1* (48%) (WANG et al. 2007).

Para representar os achados, a Figura 4 apresenta um dos casos em que houve perda do heterodímero MLH1/PMS2 e um caso em que houve perda do heterodímero MSH2/MSH6.



Legenda: A – Caso de ausência de expressão para o heterodímero MLH1/PMS2. B – Caso de ausência de expressão para o heterodímero MSH2/MSH6. (-) indica ausência de expressão. (+) indica presença de expressão.

Figura 4 - Fotos de imunoistoquímica de casos com ausência de expressão protéica.

Foi encontrado apenas um caso de ausência protéica isolada de MLH1, achado provavelmente decorrente de hipermetilação do promotor do gene, caso que foi encaminhado a outro estudo para busca de mutação no gene *BRAF*.

Os resultados apresentados mostram uma porcentagem de 6,3% de ausência protéica isolada para a proteína PMS2. Este dado é condizente com a literatura. Foram identificados recentemente quatro rearranjos genômicos em *PMS2* em um grupo de 112 pacientes suspeitos para síndrome de Lynch que foram negativos para mutações em *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*. Além disso, em um grupo de oito indivíduos com ausência de marcação na imunoistoquímica para PMS2, apenas em um tumor relacionado à síndrome de Lynch foram encontradas três diferentes mutações pontuais patogênicas no gene *PMS2*. O achado demonstrou o papel de *PMS2* na síndrome de Lynch. Mutações em *PMS2* têm sido descritas em pacientes com síndrome de Turcot, possivelmente com um padrão de herança recessivo (HENDRIKS et al. 2006b). Outro estudo mostrou que de 12 tumores MSH-H que mantiveram expressões dos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, 8 deles mostraram perda de expressão de PMS2 (HALVARSSON et al. 2006).

A Tabela 8 mostra os achados da imunoistoquímica em relação à classificação das famílias dos indivíduos analisados.

Tabela 8 – Classificação clínica de acordo com os CAI, CAII, CCF e B em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Classificação		Sem alteração	Com alteração	Total
Amsterdam I	número	10	18	28
	Porcentagem	35,7%	64,3%	29,8%
Amsterdam II	número	0	2	2
	Porcentagem	0%	100%	2,1%
CCF	número	24	4	28
	Porcentagem	85%	14,3%	29,8%
Bethesda	número	31	6	37
	Porcentagem	83,8%	16,2%	38,9%
Total	número	65	30	95
	Porcentagem	68,4%	31,6%	100%

$p < 0,001$ (Teste Qui-quadrado)

CCF = pacientes que preenchem pelo menos 3 dos critérios de Amsterdam

O resultado mostra, de forma significativamente estatística ($p < 0,001$) que os pacientes classificados como Amsterdam I ou II apresentam alteração nas proteínas de reparo com maior frequência (64,3% e 100%) do que os pacientes classificados como CCF ou Bethesda (14,3% e 16,2%). Este dado é condizente com a literatura. Em relação à frequência entre os pacientes no estudo, 31,9% preenchiam os critérios de Amsterdam, 29,8% preenchiam os critérios CCF e 38,9% preenchiam os critérios de Bethesda.

A Tabela 9 mostra a relação entre o sexo e os achados de imunoistoquímica.

Tabela 9 – Sexo em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Sexo		Sem alteração	Com alteração	Total
Masculino	número	23	14	37
	porcentagem	62,2%	37,8%	38,9%
Feminino	número	42	16	58
	porcentagem	72,4%	27,6%	61,1%
Total	número	65	30	95
	porcentagem	68,4%	31,6%	100%

p = 0,295 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra, ainda que não de forma estatisticamente significativa, que o sexo masculino apresentou maior frequência de alteração protéica do que em relação às mulheres (37,8% x 27,6%). Em relação à frequência entre os pacientes, 61,1% pertenciam ao sexo feminino.

A Tabela 10 mostra a relação da localização do tumor no cólon com os achados de imunoistoquímica. Serão relatados os dados de 90 pacientes. Os demais possuíam localização do adenocarcinoma ignorada ou apenas adenomas.

Tabela 10 – Localização do adenocarcinoma em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Localização Tumor CCR		Sem alteração	Com alteração	Total
Cólon direito	número	12	24	36
	porcentagem	33,3%	66,7%	40%
Cólon esquerdo	número	18	2	20
	porcentagem	90%	10%	22,2%
Reto	número	31	3	34
	porcentagem	91,2%	8,8%	37,8%
Total	número	61	29	90
	porcentagem	67,8%	32,2%	100%

p < 0,001 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$), que a maioria dos pacientes que apresentaram alteração de expressão protéica possuíam adenocarcinoma localizado do lado direito do cólon, o que é condizente com a literatura. Em relação à frequência entre os pacientes, a localização apresentou-se quase uniformemente distribuída.

A Tabela 11 mostra a relação entre os tumores primários apresentados pelo indivíduo e os achados de imunoistoquímica.

Tabela 11 – Tumores primários em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Tumores primários		Sem alteração	Com alteração	Total
Adenoma ou um tumor primário	número	59	17	76
	porcentagem	77,6%	22,4%	80%
Dois tumores primários ou mais	número	6	13	19
	porcentagem	31,6%	68,4%	20%
Total	número	65	30	95
	porcentagem	68,4%	31,6%	100%

$p < 0,001$ (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra maior frequência de alteração protéica para os pacientes que apresentaram dois ou mais tumores primários do que os pacientes que apresentaram adenomas ou apenas um tumor primário (68,4% x 22,4%). Em relação à frequência entre os pacientes, 80% possuíam adenomas ou apenas um tumor primário. Dentro os demais tumores, três pacientes apresentaram tumores de endométrio (idade média de diagnóstico de 47,67 anos), um de estômago (idade média de diagnóstico de 42 anos), um hepatobiliar (idade média de diagnóstico de 50 anos), dois de intestino delgado (idade média de diagnóstico de 48 anos), um de pelve renal e ureter (idade média de diagnóstico de 44 anos) e três de mama (idade

média de diagnóstico de 47 anos). A média de idade de diagnóstico dos pacientes com adenocarcinomas colorretais foi de 44,7 anos.

Os estudos mostram que o risco cumulativo para desenvolvimento de qualquer câncer aos 70 anos é estimado em 65% a 90% para portadores de mutação em *MLH1* e *MSH2* e até 73% para portadores de mutação em *MSH6*. A idade média de diagnóstico de câncer colorretal é 43 a 46 anos para portadores de mutação em *MLH1* e *MSH2* e de 51 a 57 anos para portadores de mutação em *MSH6*. O câncer de endométrio, que é geralmente diagnosticado 5 anos depois do câncer colorretal, mostra tendência similar de idade de acometimento, independente do gene mutado do portador (PELTOMÄKI 2005).

A Tabela 12 mostra a relação entre o Estádio T e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 72 pacientes, dos quais foi possível obter tal estadiamento.

Tabela 12 – Estadiamento T em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Estadiamento T		Sem alteração	Com alteração	Total
T1	número	1	4	5
	Porcentagem	20%	80%	6,9%
T2	número	17	7	24
	Porcentagem	70,8%	29,2%	33,3%
T3	número	24	5	29
	Porcentagem	82,8%	17,5%	40,3%
T4	número	8	6	14
	Porcentagem	57,1%	42,9%	19,4%
Total	número	50	22	72
	Porcentagem	69,4%	30,6%	100%

p = 0,027 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra que houve diferenças significativas entre o Estádio T e os achados de alterações protéicas, o que pode ser explicado pelo fato de os pacientes que preenchem os critérios clínicos são rastreados periodicamente, de forma que é maior a chance de encontrar tumores nos estádios iniciais. Em relação à frequência entre os pacientes, 33,3% apresentou estadiamento classificado com T2 e 40,3% como T3.

A Tabela 13 mostra a relação entre o Estádio N e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 79 pacientes, dos quais foi possível obter tal estadiamento.

Tabela 13 – Estadiamento N em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Estadiamento N		Sem alteração	Com alteração	Total
N0	número	36	22	58
	porcentagem	62,1%	37,9%	73,4%
N1	número	11	3	14
	porcentagem	78,6%	21,4%	17,7%
N2	número	7	0	7
	porcentagem	100%	0%	8,9%
Total	número	54	25	79
	porcentagem	68,4%	31,6%	100%

p = 0,083 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre o Estádio N e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 73,4% apresentou estadiamento classificado com N0.

A Tabela 14 mostra a relação entre o Estádio M e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 93 pacientes, dos quais foi possível obter tal estadiamento.

Tabela 14 – Estadiamento M em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Estadiamento M		Sem alteração	Com alteração	Total
M0	número	49	20	69
	porcentagem	71%	29,9%	74,2%
M1	número	16	8	24
	Porcentagem	67,7%	33,3%	25,8%
Total	número	65	28	93
	Porcentagem	69,9%	30,1%	100%

p = 0,689 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre o Estádio M e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 74,2% apresentou estadiamento classificado com M0.

A Tabela 15 mostra a relação entre Invasão Sanguínea e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 70 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 15 – Invasão sanguínea em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Invasão Sanguínea		Sem alteração	Com alteração	Total
Ausente	número	34	13	47
	Porcentagem	72,3%	27,7%	67,1%
Presente	número	16	7	23
	Porcentagem	69,6%	30,4%	32,9%
Total	número	50	20	70
	Porcentagem	71,4%	28,6%	100%

p = 0,809 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre a Invasão Sanguínea e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 67,1% apresentou adenocarcinomas classificados com presença de invasão sanguínea.

A Tabela 16 mostra a relação entre Invasão Linfática e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 70 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 16 – Invasão linfática em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Invasão Linfática		Sem alteração	Com alteração	Total
Ausente	número	29	12	41
	Porcentagem	70,7%	29,3%	58,6%
Presente	número	21	8	29%
	Porcentagem	72,4%	27,6%	41,4%
Total	número	50	20	70
	Porcentagem	71,4%	28,6%	100%

p = 0,878 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre a Invasão Linfática e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 58,6% apresentou adenocarcinomas com invasão linfática.

A Tabela 17 mostra a relação entre Invasão Perineural e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 67 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 17 – Invasão perineural em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Invasão Perineural		Sem alteração	Com alteração	Total
Ausente	número	31	11	42
	Porcentagem	73,8%	26,2%	62,7%
Presente	número	17	8	25
	Porcentagem	68%	32%	37,3%
Total	número	48	19	67
	Porcentagem	78,6%	28,4%	100%

p = 0,620 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre a Invasão Perineural e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 62,7% apresentou adenocarcinomas com invasão perineural.

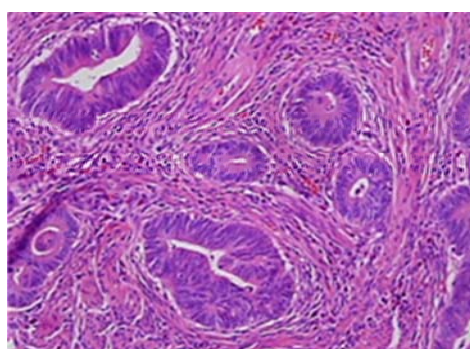
A Tabela 18 mostra a relação entre o Grau de Diferenciação e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 76 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 18 – Grau de diferenciação da neoplasia em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

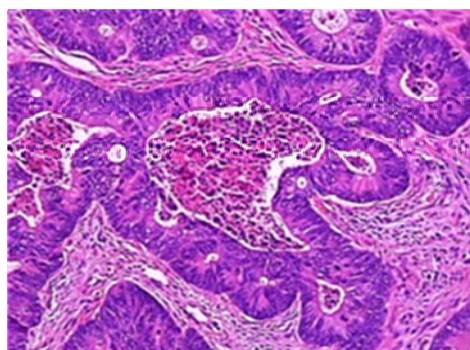
Grau de diferenciação		Sem alteração	Com alteração	Total
Bem	número	4	5	9
	Porcentagem	44,4%	55,6%	11,8%
Moderado	número	45	21	66
	Porcentagem	68,2%	31,8%	86,8%
Pouco	número	1	0	1
	porcentagem	100%	0%	1,3%
Total	número	50	26	76
	Porcentagem	65,8%	34,2%	100%

p = 0,285 (Teste Qui-quadrado)

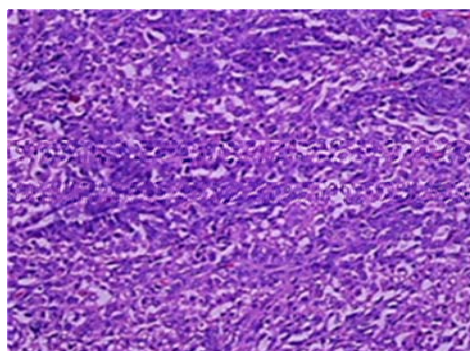
O resultado mostra que não houve diferenças marcantes entre o grau de diferenciação e os achados de alterações protéicas. As frequências indicam maior probabilidade de alteração quanto mais diferenciado for o adenocarcinoma. Em relação à frequência da classificação entre os pacientes, a grande maioria (86,8%) apresentou adenocarcinomas moderadamente diferenciados. A Figura 5 mostra exemplos dos graus de diferenciação dos adenocarcinomas.



**Adenocarcinoma
Bem diferenciado**



**Adenocarcinoma
Moderadamente diferenciado**



**Adenocarcinoma
Pouco diferenciado**

Figura 5 - Graus de diferenciação dos adenocarcinomas segundo a OMS.

A Tabela 19 mostra a relação entre o Infiltrado tipo Crohn e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 52 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 19 – Infiltrado tipo Crohn em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Infiltrado tipo Crohn		Sem alteração	Com alteração	Total
Ausente	número	33	18	51
	Porcentagem	64,7%	35,3%	98,1%
Presente	número	1	0	1
	Porcentagem	100%	0%	1,9%
Total	número	34	18	52
	Porcentagem	65,4%	34,6%	100%

p = 1,000 (Teste Exato de Fisher)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre o Infiltrado tipo Crohn e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 98,1% apresentou adenocarcinomas sem esta característica.

A Tabela 20 mostra a relação entre o Infiltrado linfocitário peritumoral e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 51 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 20 – Infiltrado linfocitário peritumoral em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Infiltrado Linfocitário Peritumoral		Sem alteração	Com alteração	Total
Ausente	número	3	1	4
	Porcentagem	75%	25%	7,8%
Presente	número	30	17	47
	Porcentagem	63,8%	36,2%	92,2%
Total	número	33	18	51
	Porcentagem	64,7%	35,3%	100%

p = 1,000 (Teste Exato de Fisher)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre o Infiltrado Linfocitário Peritumoral e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 92,2% apresentou adenocarcinomas com esta característica.

A Tabela 21 mostra a relação entre Desmoplasia e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 50 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 21 – Desmoplasia em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Desmoplasia		Sem alteração	Com alteração	Total
Ausente	número	18	7	25
	Porcentagem	72%	28%	50%
Presente	número	14	11	25
	Porcentagem	56%	44%	50%
Total	número	32	18	50
	Porcentagem	64%	36%	100%

p = 0,239 (Teste Qui-quadrado)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre Desmoplasia e os achados de alterações protéicas, e também em relação à frequência entre os pacientes, sendo que 50% dos casos apresentaram e 50% dos casos não apresentaram esta característica.

A Tabela 22 mostra a relação entre a presença de *Budding* e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 86 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação.

Tabela 22 – *Budding* em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

<i>Budding</i>		Sem alteração	Com alteração	Total
Ausente	número	53	27	80
	Porcentagem	66,2%	33,8%	93%
Presente	número	5	1	6
	Porcentagem	83,3%	16,7%	7%
Total	número	58	28	86
	Porcentagem	67,4%	32,6%	100%

p = 0,659 (Teste Exato de Fisher)

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre *Budding* e os achados de alterações protéicas. Em relação à frequência entre os pacientes, 93% dos casos não apresentaram esta característica. A Figura 6 mostra exemplos de *Budding* nos adenocarcinomas analisados.

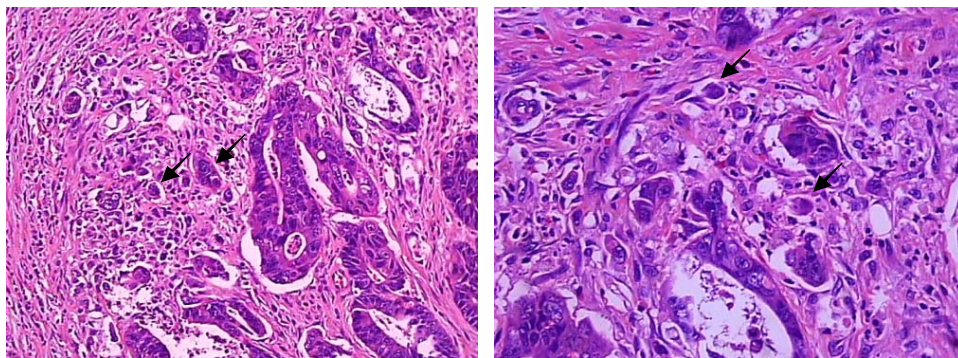


Figura 6 - Fotos de lâminas mostrando casos de adenocarcinomas que apresentam *budding*. As setas mostram os agrupamentos celulares.

A Tabela 23 mostra a relação entre o Tipo Histológico do Adenocarcinoma e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 80 pacientes, dos quais foi possível obter tal informação. Os demais possuíam classificação do adenocarcinoma ignorada ou apenas adenomas.

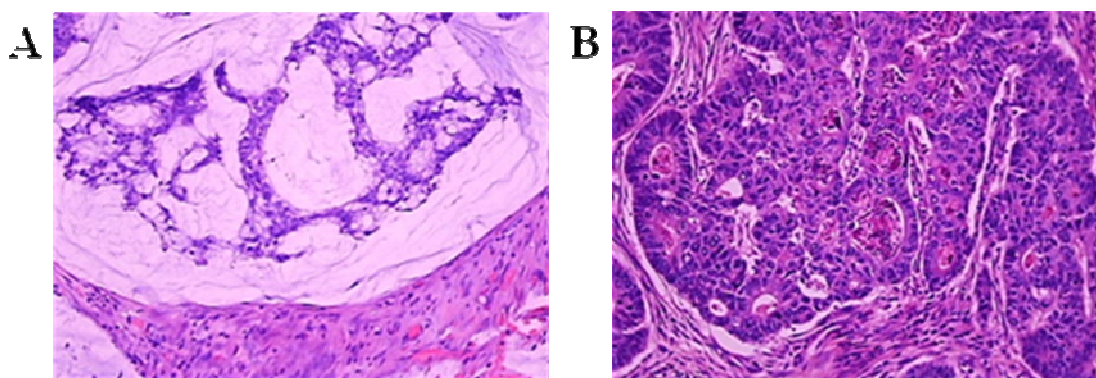
Tabela 23 – Tipo histológico em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Tipo Histológico Adenocarcinoma		Sem alteração	Com alteração	Total
Tubular	número	34	15	49
	porcentagem	69,4%	30,6%	61,2%
Componente Mucinoso	número	5	11	16
	porcentagem	31,2%	68,8%	20%
Cribriforme	número	6	1	7
	porcentagem	85,7%	14,3%	8,8%
Outros	número	8	0	8
	porcentagem	100%	0%	10%
Total	número	53	27	80
	porcentagem	62,2%	33,8%	100%

p = 0,003 (Teste Qui-Quadrado)

Outros = tipo medular ou com células em anel de sinete

O resultado mostra que não houve diferenças significativas entre o Tipo Histológico e os achados de alterações protéicas. Os adenocarcinomas com componente mucinoso apresentam maior frequência de alteração (68,8% deles apresentam alteração protéica), o que valida os dados apresentados pela literatura. Os adenocarcinomas cribiformes apresentam menor frequência de alteração (14,3%). Em relação à frequência entre os pacientes, 61,2% dos casos apresentaram adenocarcinomas tubulares. A Figura 7 mostra exemplos de dois tipos histológicos de adenocarcinomas, um com componente mucinoso e um cribiforme.



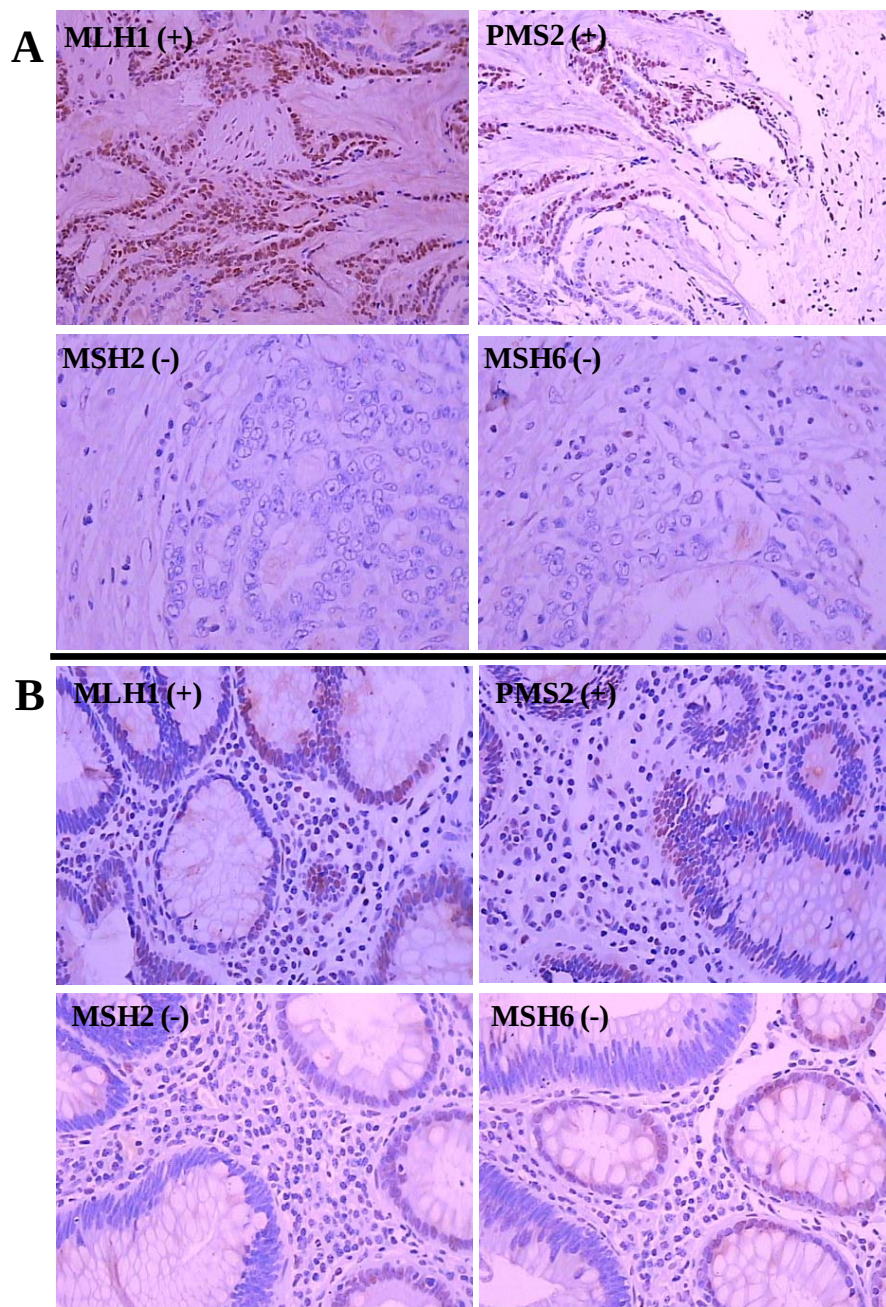
Legenda: A – Representação de um adenocarcinoma com componente mucinoso. B – Representação de um adenocarcinoma cribiforme.

Figura 7 - Fotos de lâminas de adenocarcinomas.

Em relação aos achados de imunoistoquímica para os adenomas, dos 15 (15,79%) pacientes que possuíam blocos de adenocarcinoma e de adenoma, os resultados para as reações de imunoistoquímica foram concordantes para todos os casos, exceto três deles. No primeiro caso, a ausência de expressão protéica para a proteína MSH6 foi verificada apenas na lâmina de adenocarcinoma analisada. O caso foi enviado a outro projeto do grupo de pesquisa, que investigará a frequência de mutações em *MSH6* em pacientes do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do

Hospital do Câncer AC Camargo através de seqüenciamento direto. No segundo caso o paciente apresentou fraca positividade para a proteína MLH1 no adenocarcinoma, porém com positividade normal no adenoma. É possível que este achado seja resultante de hipermetilação do promotor do gene *MLH1*. E no terceiro caso, que apresentou dois adenomas, um dos adenomas apresentou resultado igual ao do adenocarcinoma (perda de PMS2), entretanto, seu segundo adenoma mostrou a perda tanto de PMS2 quanto de MLH1. Os dois últimos pacientes serão avaliados quanto à presença de mutação em *BRAF*.

De acordo com BAUDHUIN et al. (2005), até 57% dos adenomas colorretais apresentam MSI. Em relação à perda de expressão protéica, dado que os adenomas são bem estabelecidos como a lesão precursora do câncer colorretal, é esperado que tal estágio pré-canceroso também apresente a perda de expressão verificada no adenocarcinoma. Estes achados indicam que a deficiência no sistema de reparo é um evento molecular precoce na carcinogênese dos tumores que seguem a via “mutante” (MÜLLER et al. 2006). A Figura 8 mostra um dos casos estudados em que houve concordância entre adenocarcinoma e adenoma quanto a perda de expressão protéica.

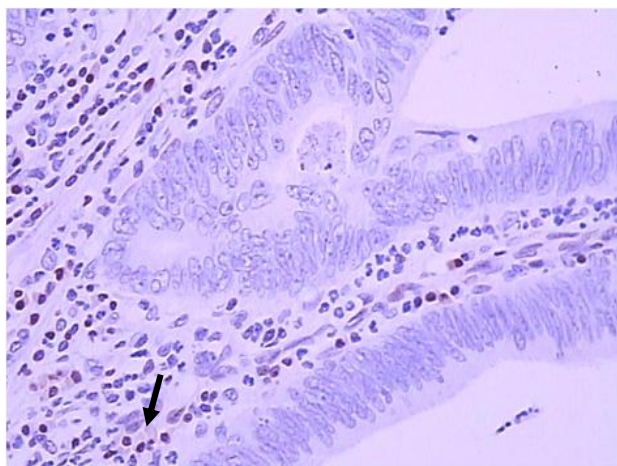


Legenda: A – Caso de ausência de expressão para o heterodímero MSH2/MSH6 no adenocarcinoma. B – Caso de ausência de expressão para o heterodímero MSH2/MSH6 no adenoma. (-) indica ausência de expressão. (+) indica presença de expressão.

Figura 8 - Fotos de imunoistoquímica de casos com ausência de expressão protéica tanto no adenocarcinoma quanto no adenoma.

Um dos casos apresentou-se de forma anômala e será relatado em particular. Um paciente classificado como Amsterdam teve um adenocarcinoma com componente mucinoso aos 36 anos de idade que apresentou perda de expressão protéica do dímero MSH2/MSH6. Aos 47 anos teve outro adenocarcinoma, também com componente mucinoso, que apresentou perda de expressão de PMS2, MSH2 e MSH6, combinação atípica de negatividade, não relatada ainda em literatura.

Dois pacientes apresentavam neoplasias de aspecto serrilhado, sendo que um dos pacientes apresentava concomitantemente adenoma e adenocarcinoma e outro apenas com adenocarcinoma. Lâminas referentes a estes 3 casos foram confeccionadas para a realização de imunoistoquímica de MGMT (*O*⁶-*Methylguanine-DNA Methyltransferase*). A lâmina do paciente que apresentava apenas o adenocarcinoma apresentou perda da expressão protéica de MGMT (Figura 9).



A seta representa a presença de positividade da marcação nos linfócitos do estroma.

Figura 9 - Adenocarcinoma colorretal demonstrando perda de expressão da proteína de reparo MGMT.

Em relação aos familiares dos pacientes analisados neste estudo, foi verificada também a relação dos tumores apresentados com a alteração nas proteínas de reparo. Dentre os pacientes analisados, dois pacientes eram da mesma família que outros dois. Assim, nesta análise, foram retirados dois pacientes por possuírem a mesma história familiar de outros dois já relacionados. A Tabela 24 mostra a média de tumores em relação aos achados de imunoistoquímica.

Tabela 24 – Média de tumores presentes nas famílias dos pacientes estudados em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo dos pacientes estudados.

Tumores	Sem alteração	Com alteração	p (Teste T)
Colorretal	2,09	5,22	p < 0,001
Endométrio	0,03	0,33	p = 0,002
Estômago	0,35	0,41	p = 0,824
Hepatobiliar	0,05	0,04	p = 0,815
Intestino Delgado	0,02	0,07	p = 0,167
Pelve Renal/Ureter	0	0	-
Ovário	0,03	0,04	p = 0,910
Pâncreas	0,11	0	p = 0,115
SNC*	0,10	0,11	p = 0,856
Sebáceo	0	0,04	p = 0,130
Mama	0,32	0,11	p = 0,098

* Sistema Nervoso Central

O resultado mostra, de forma estatisticamente significativa, o envolvimento maior dos tumores colorretais e de endométrio na síndrome de Lynch, o que já foi mostrado em estudo anterior deste serviço que buscou caracterizar a frequência de tumores extra-colônicos em pacientes que preenchiam os critérios clínicos para a síndrome de Lynch com pacientes do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital AC Camargo (FERREIRA et al. 2004). O estudo avaliou 61 famílias

suspeitas de síndrome de Lynch, onde foram estudados 347 indivíduos, sendo observados 212 tumores colorretais e 169 tumores extra-colônicos. O tumor mais freqüente nos homens, associado ao CCR, foi o de estômago, com uma taxa de incidência para as famílias com síndrome de Lynch de 3.762,37/100.000; esse tumor não está agrupado dentre os tumores descritos nos Critérios de Amsterdam. Nas mulheres, o tumor mais freqüentemente encontrado foi o de mama, que também não está agrupada dentre os tumores descritos nos Critérios de Amsterdam, com um taxa de incidência de 1.993,86/100.000 para as famílias com síndrome de Lynch.

No presente estudo, os familiares dos pacientes com alteração nas proteínas de reparo apresentaram uma menor incidência de câncer de mama quando comparada com aqueles pacientes com história familiar de câncer colorretal, mas sem a perda das proteínas de reparo. Este achado pode ser decorrente de um agrupamento familiar em virtude de outras síndromes de predisposição ao câncer colorretal, que podem sugerir outros mecanismos genéticos. MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) publicaram um estudo sobre famílias com associação entre câncer colorretal e câncer de mama. As famílias foram testadas para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, e para os genes de reparo relacionados à síndrome de Lynch. No grupo sem mutações identificadas nesses genes, mas com fenótipo familiar de câncer mama-cólon, houve significativo aumento da incidência da mutação *CHEK2 1100delC* (18,2%) em relação às famílias sem o mesmo fenótipo. Os achados dos estudos nesta instituição podem sugerir uma associação da mutação de *CHEK2 1100delC* nas pacientes estudadas.

Em relação aos demais tumores, o número pouco expressivo pode ser explicado pela falta de gerações acometidas, já que a amostra estudada possui mais da metade dos casos de pacientes que preenchem apenas os critérios de Bethesda ou

CCF. Além disso, é preciso considerar o diagnóstico de Síndrome de Li Fraumeni, uma síndrome rara causada por mutações no gene *TP53*. Inicialmente, a caracterização do espectro tumoral da síndrome tinha como principais critérios para diagnóstico: osteossarcomas, sarcomas de partes moles, câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, tumores cerebrais, tumores adrenocorticais e leucemias agudas. Atualmente também são relacionados os tumores de cólon e reto, estômago, pulmão, melanoma e tumores de células germinativas (BIRCH et al. 2001).

As análises dos tumores extra-colônicos apresentados pelos familiares em relação às alterações encontradas na imunoistoquímica revelam maior frequência de alteração do heterodímero MSH2/MSH6, para todos os tumores. Das nove famílias que apresentaram câncer de endométrio entre os familiares, em cinco delas foram encontradas alterações em MSH2/MSH6, em uma foi encontrada alteração no heterodímero MLH1/PMS2, em uma foi encontrada alteração em PMS2 e em duas famílias não foram encontradas alterações. Das 22 famílias que apresentaram câncer de estômago entre os familiares, em cinco delas foram encontradas alterações em MSH2/MSH6, em duas foram encontradas alterações no heterodímero MLH1/PMS2, em 15 famílias não foram encontradas alterações. O achado de 15 famílias com acometimento de câncer de estômago deve-se a alta incidência de câncer de estômago na população brasileira. De acordo com dados do INCA, são estimados 7.200 novos casos de câncer de estômago para homens em 2008, número maior do que o número esperado para câncer colorretal, e 3.950 novos casos de câncer de estômago para mulheres em 2008, número menor do que o esperado para câncer colorretal (Ministério da Saúde 2007). Das três famílias que apresentaram câncer de intestino delgado entre os familiares, em duas delas foram encontradas alterações em

MSH2/MSH6 e em uma família não foi encontrada alteração. E por fim, das 19 famílias com acometimento de câncer de mama, apenas em uma delas foi encontrada alteração em MSH2/MSH6. As demais 18 famílias não apresentaram alteração nas proteínas analisadas na imunoistoquímica, o que ressalta a possibilidade de envolvimento de outras síndromes de predisposição ao câncer.

Em relação aos 12 pacientes oriundos do Hospital Italiano na Argentina, dois deles apresentaram ausência de expressão protéica do heterodímero MLH1/PMS2 (16,67%). Nenhum paciente do Uruguai apresentou perda de expressão protéica dos genes de reparo. Devido ao fato de que não foi possível obter os dados anteriormente analisados destes pacientes, conjuntamente com a diminuta quantidade de casos, não foi possível realizar análises mais detalhadas destes pacientes.

E finalmente, é importante avaliar as proteínas de reparo de tumores de pacientes que preenchem os critérios clínicos para síndrome de Lynch, pois, alguns casos de mutações *missense* ou alterações sem mudar o *frame* de transcrição, que não afetam diretamente as proteínas de reparo, podem ainda, conferir um aumento no risco de câncer por mecanismos que explicam a patogenicidade, como levar a instabilidade da proteína ou alterar a sua habilidade de induzir a apoptose (PELTOMÄKI 2005). Dessa maneira, a caracterização genética, bioquímica e clínica das alterações nas proteínas de reparo e seus fenótipos associados têm o potencial de revelar mecanismos alternativos de patogenicidade e ligações com novas vias biológicas, o que podem ser úteis no desenho de estratégias preventivas e terapêuticas no futuro.

4.2 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

4.2.1 Marcadores

A fim de aperfeiçoar os resultados e reduzir falsos negativos, o painel organizado pelo NCI em 1998 sugere que sejam pesquisados pelo menos cinco microssatélites (BAUDHUIN et al. 2005). Entretanto, em razão da complexidade do exame, alguns autores sugerem que a pesquisa de um único microssatélite, denominado BAT26, possa ser suficiente para evidenciar a existência de MSI, já que este marcador possui sensibilidade próxima de 100% (NASH 2003; CARVALHO et al. 2005). Já outros autores acreditam que deveria ser considerado o maior número de marcadores possíveis, para concluir com precisão a instabilidade de determinado tumor (BOLAND et al. 1998; THIBODEAU et al. 1998). No presente estudo, a utilização apenas do marcador BAT26 não detectaria todos os casos que foram classificados como MSI-H com o uso de 10 marcadores, conforme será descrito a seguir.

Além disso, muitos pesquisadores utilizam os marcadores BAT26 e BAT25 sem a correspondência do tecido normal, pois são marcadores mais conservados entre indivíduos. Entretanto, dependendo da etnia do indivíduo, alelos menores podem ser encontrados (IMAI e YAMAMOTO 2008). Em se tratando da população brasileira, que possui miscigenação de etnias, tal análise excluindo-se a referência do tecido normal poderia levar a resultados falso-positivos. No presente estudo, todos os casos que apresentaram o marcador BAT26 estável apresentaram alelos de tamanhos fora do intervalo de tamanho dos alelos apresentados pelos casos que apresentaram este marcador estável, ou seja, o uso de apenas tecido tumoral para detectar

instabilidade seria suficiente para caracterizar todos os casos instáveis para este marcador, considerando o intervalo de tamanho para os alelos entre 113,89 e 121,63 pb de acordo, e para esta população estudada. Já o marcador BAT25 não possibilitaria o uso apenas de tecido tumoral para as análises, já que tanto os casos que apresentaram este marcador instável, quanto os casos que apresentaram este marcador estável, apresentaram alelos no mesmo intervalo de tamanho, entre 111,20 e 122,64, para esta população estudada.

4.2.2 Extração de DNA e Amplificação das Amostras Emblocadas em Parafina

Amostras de blocos de parafina e uma amostra de tecido fresco de cólon normal foram selecionadas para extração de DNA com o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as orientações do fabricante. A amostra de tecido fresco foi utilizada como controle da extração.

Os DNAs extraídos foram quantificados no NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, Estados Unidos). A quantidade obtida de DNA das amostras de parafina não foi satisfatória (entre 4 a 6 ng/μl), enquanto que a quantidade de DNA do tecido fresco se mostrou adequada para reações de PCR (48,5 ng/μl), o que indica que esta reação ocorreu como esperado.

Mesmo não obtendo quantidade de DNA adequada da amostra de parafina, decidiu-se prosseguir para um passo de amplificação da mesma e também da amostra de tecido fresco. Como um controle positivo desta reação, utilizou-se um DNA extraído de sangue que já havia sido testado com sucesso. A reação de amplificação foi realizada de acordo com o ciclo acima descrito utilizado na *Mayo Clinic*

(Rochester, Estados Unidos). Foram utilizados dois pares de primers do laboratório que apresentavam bons resultados. Primer A – gene MSH2. Primer B – gene MSH6.

A Figura 10 mostra o resultado da reação de PCR em gel de agarose 0,8% com voltagem de 100 mV.

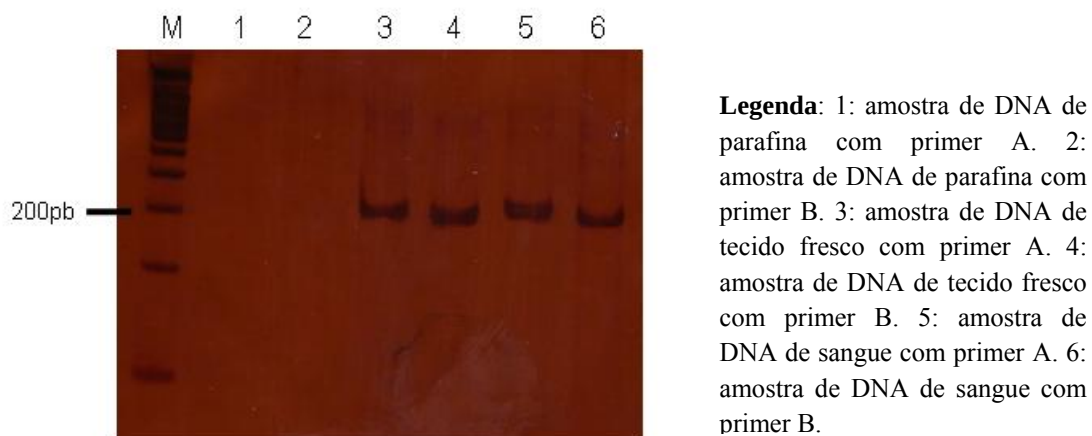


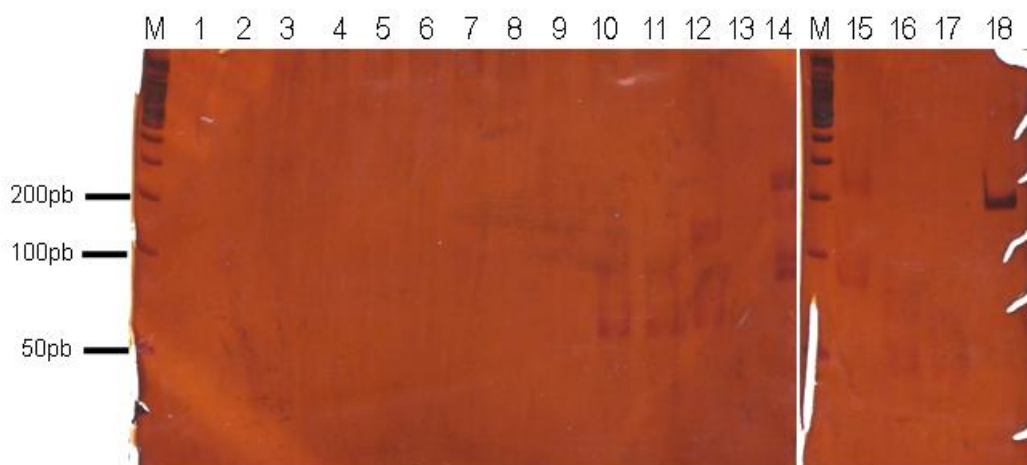
Figura 10 – Teste de amplificação das amostras. M - marcador de peso molecular.

O resultado mostra que não houve amplificação do DNA extraído de parafina, conforme já hipotetizado, provavelmente devido à pequena quantidade de DNA.

Paralelamente às tentativas de extração de DNA de parafina, buscou-se testar os primers de MSI. Foram escolhidos inicialmente os pares dos marcadores BAT26, D5S346, D17S250 e ACTC para teste com duas marcas de enzimas Taq Polimerase, Taq Gold (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos) e Taq Platinum (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos), objetivando melhor eficiência. O ciclo e quantidade de reagentes utilizados seguiram as orientações do protocolo fornecido pela *Mayo Clinic* e descrito em “materiais e métodos”. Foi

utilizado o DNA de tecido fresco de cólon para os testes, já que apresentou quantidade adequada.

As temperaturas de anelamento sugeridas pela *Mayo Clinic* é a mesma para todos os pares de primers (55°C). Entretanto, buscando maior eficiência da reação, haja vista que a quantidade de DNA seria limitante na reação, foram encontradas no programa de predição e simulação de PCR da Universidade Santa Cruz, Califórnia (www.genome.ucsc.edu) temperaturas de anelamento diferentes, de acordo com os tamanhos dos primers e conteúdo das bases nitrogenadas (purínicas e pirimidínicas). Assim, na reação de PCR a seguir (Figura 11) foram testados 2 Taqs Polimerase, 4 pares de primers e 2 temperaturas de anelamento.



Legenda: M – marcador de peso molecular. 1 a 9: Taq Gold. 1: primer BAT26 e TM 55°C. 2: primer BAT26 e TM 63°C. 3: primer D5S346 e TM 55°C. 4: primer D5S346 e TM 70°C. 5: primer D17S250 e TM 55°C. 6: primer D17S250 e TM 59°C. 7: primer ACTC e TM 55°C. 8: primer ACTC e TM 68°C. 9: Primer controle. 10 a 18: Taq Platinum. 10: primer BAT26 e TM 55°C. 11: primer BAT26 e TM 63°C. 12: primer D5S346 e TM 55°C. 13: primer D5S346 e TM 70°C. 14: primer D17S250 e TM 55°C. 15: primer D17S250 e TM 59°C. 16: primer ACTC e TM 55°C. 17: primer ACTC e TM 68°C. 18: Primer controle. DNA extraído de tecido fresco de cólon.

Figura 11 – Teste de amplificação das amostras extraídas.

Primeiro teste: as reações com a Taq Gold não apresentaram resultado satisfatório. As reações com a Taq Platinum embora apareçam fracas, apresentam algum resultado. Segundo teste: os quatro primers testados mostraram amplificação com a Taq Platinum. Terceiro teste: apesar dos tamanhos e conteúdo das bases dos primers, as bandas mais intensas se apresentaram com temperatura de anelamento de 55°C.

A presença de bandas inespecíficas deve-se ao fato de que os primers confeccionados foram otimizados para amplificação de DNA oriundo de blocos de parafina. De acordo com resultados de testes realizados, o DNA obtido de amostras emblocadas em parafina apresenta-se altamente degradado, de forma que é possível obter fragmentos apenas em torno de 200 pb, sendo bastante variável e dependente da espécie para fragmentos acima deste tamanho. Assim, as bandas inespecíficas apresentadas neste gel devem-se ao fato de que foi utilizada uma amostra de DNA de tecido fresco de cólon para as reações.

É possível perceber ainda, que a intensidade das bandas de amplificação com os primers de MSI são menores do que com o primer controle, o que demonstra a menor eficiência destes, provavelmente devido ao grau de expressão de determinado gene e ainda, dado a marcação com compostos fluorescentes dos primers.

As reações acima apresentadas foram feitas em termociclador com gradiente de temperatura, entretanto, o ciclo a ser escolhido deve ser apenas um por reação. Como no resultado apresentado comparou-se a atuação de Taqs Polimerases diferentes, buscou-se posteriormente ajustar melhor o ciclo de acordo com as necessidades da Taq Platinum, já que o ciclo anterior se ajustava melhor às necessidades da Taq Gold, que não apresentou resultado satisfatório (Figura 12). A

temperatura de anelamento escolhida foi que melhor apresentou resultado, 55°C, e o DNA foi o mesmo utilizado.

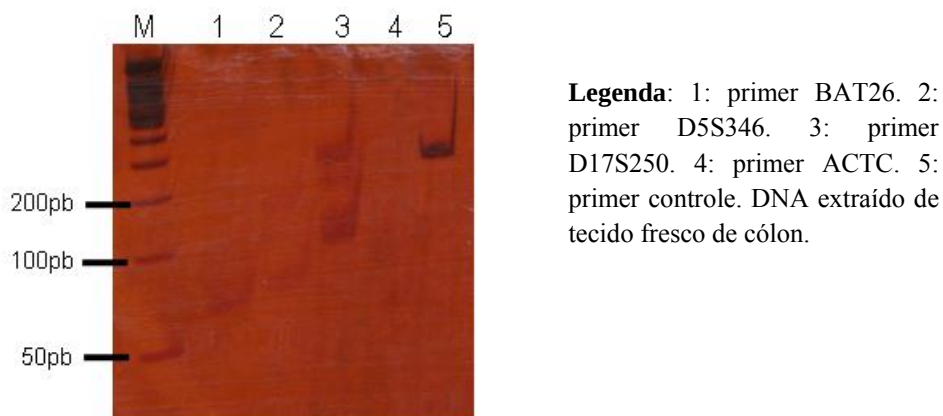
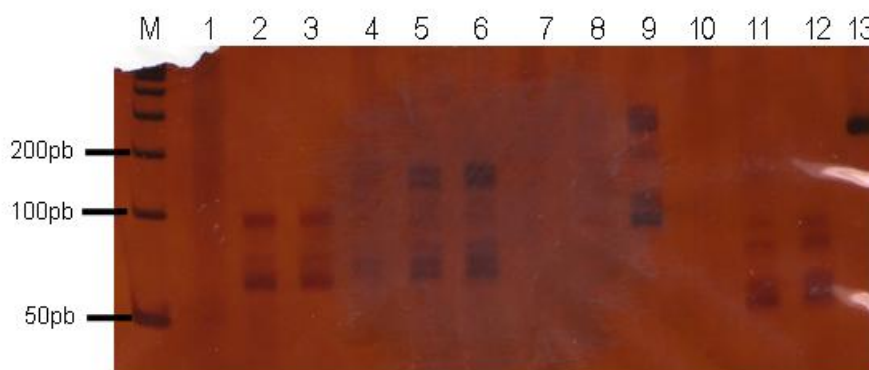


Figura 12 – Teste de amplificação. M – marcador de peso molecular.

Aparentemente não houve grande variação na amplificação. Assim, buscando maior eficiência na reação, foram testadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) na reação. Todas as reações foram feitas com um volume final de 20 μ l de reação, DNA de tecido fresco de cólon e temperatura de anelamento de 55°C (Figura 13).

De acordo com as quantidades de $MgCl_2$ utilizadas nas reações anteriores, decidiu-se utilizar o seguinte gradiente:

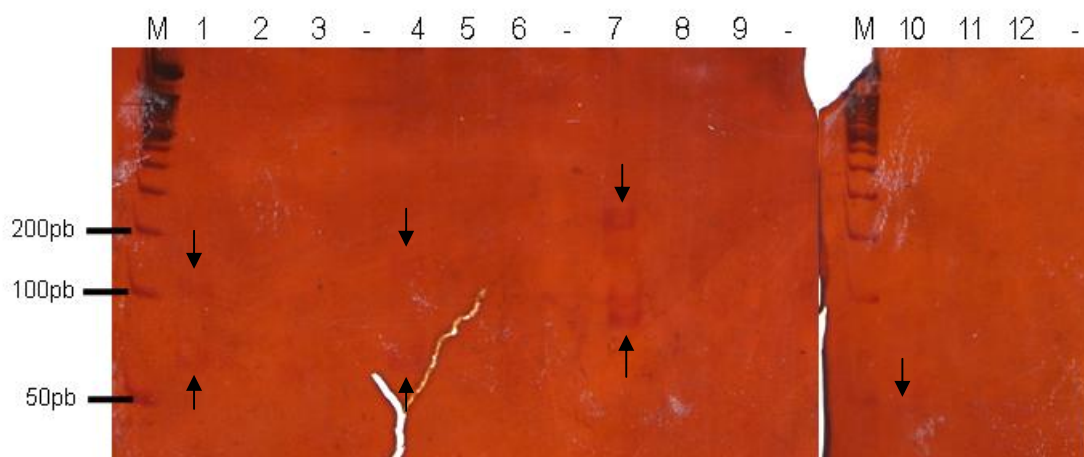
- primers BAT16 e D5S346: 0,8 μ l, 1,2 μ l e 1,6 μ l.
- primers D17S250 e ACTC: 0,4 μ l, 0,8 μ l e 1,2 μ l.



Legenda: M – marcador de peso molecular. 1: primer BAT26 e 0,8 µl de MgCl₂. 2: primer BAT26 e 1,2 µl de MgCl₂. 3: primer BAT26 e 1,6 µl de MgCl₂. 4: primer D5S346 e 0,8 µl de MgCl₂. 5: primer D5S346 e 1,2 µl de MgCl₂. 6: primer D5S346 e 1,6 µl de MgCl₂. 7: primer D17S250 e 0,4 µl de MgCl₂. 8: primer D17S250 e 0,8 µl de MgCl₂. 9: primer D17S250 e 1,2 µl de MgCl₂. 10: primer ACTC e 0,4 µl de MgCl₂. 11: primer ACTC e 0,8 µl de MgCl₂. 12: primer ACTC e 1,2 µl de MgCl₂. 13: controle positivo.

Figura 13 – Teste de amplificação dos primers.

O resultado mostra que os quatro primers apresentaram melhor resultado de amplificação com 1,2 µl de MgCl₂. As bandas inespecíficas apresentadas devem-se ao tipo de DNA utilizado. Obtida esta padronização, decidiu-se testar o DNA oriundo de parafina. Foram utilizadas duas amostras de DNA de parafina e um controle de tecido fresco (Figura 14).



Legenda: M – marcador de peso molecular. 1: primer BAT26 e DNA fresco. 2: primer BAT26 e DNA parafina1. 3: primer BAT26 e DNA parafina2. 4: primer D5S346 e DNA fresco. 5: primer D5S346 e DNA parafina1. 6: primer D5S346 e DNA parafina2. 7: primer D17S250 e DNA fresco. 8: primer D17S250 e DNA parafina1. 9: primer D17S250 e DNA parafina2. 10: primer ACTC e DNA fresco. 11: primer ACTC e DNA parafina1. 12: primer ACTC e DNA parafina2.

Figura 14 – Teste de amplificação das amostras de parafina.

Apesar de difícil visualização na foto apresentada, no momento da revelação do gel foi possível verificar bandas com os mesmos padrões apresentados anteriormente, apenas para as canaletas onde continham as reações feitas com DNA de tecido fresco, o que demonstra que o DNA extraído não apresenta quantidade nem qualidade satisfatória.

Como o protocolo até então seguido é o mesmo utilizado em outros lugares do mundo, como na Mayo Clinic, por exemplo, onde a análise de instabilidade de microssatélites é feita em sua rotina laboratorial, surgiu a hipótese de que o material utilizado nesta Instituição não apresentaria DNA de boa qualidade. Um potencial interferente seria a qualidade da Formalina utilizada, já que o serviço já usa formalina tamponada desde o ano de 1997. Para testar tal hipótese, realizou-se a fixação do tecido com formalina da marca Merck (Darmstadt, Alemanha) e DEPC (*diethylpyrocarbonate*), a qual é considerada uma formalina de excelente qualidade.

Além disso, realizou-se novos testes com diferentes metodologias de extração de DNA.

O primeiro método a ser testado foi o *Pico Pure DNA Extraction Kit* (Arcturus, MDS *Analytical Technologies*, Califórnia, Estados Unidos), realizado seguindo as orientações do fabricante.

Para os testes foram selecionados dois blocos recentes que se encontravam armazenados no arquivo do Hospital e uma amostra de tecido fresco, e dois blocos de biópsias de cólon feitas na Instituição cujos tecidos foram fixados com Formalina Merck + DEPC. Para evitar interferência relacionada à idade do material utilizado, buscou-se usar amostras muito recentes do arquivo deste Serviço. Após a extração das amostras, o DNA foi quantificado no NanoDrop ND-1000. O resultado é mostrado a seguir:

Amostra	[DNA]	A260/A280
1) bloco arquivo A	→ 98 ng/μl	→ 0,99
2) bloco arquivo B	→ 77,8 ng/ μl	→ 0,88
3) bloco Merck A	→ 130 ng/ μl	→ 1,09
4) bloco Merck B	→ 137,9 ng/ μl	→ 1,09
5) tecido fresco	→ 73,3 ng/ μl	→ 1,09

De acordo com SAMBROOK e RUSSEL (2000) a razão de pureza A260/A280 ideal que fornece maior quantidade de DNA é 1,8. Valores menores representam contaminação por proteínas ou fenóis. Assim, foi possível verificar que este kit de extração de DNA apesar de fornecer um alto valor de quantificação, este valor não corresponde somente a DNA.

Como as razões A260/A280 entre as amostras foram parecidas, é possível compará-las entre si em relação a quantidade de DNA. Assim, como é possível

perceber, as amostras fixadas com formalina Merck apresentam quantidades superiores de DNA em relação as amostras do arquivo.

As amostras de DNA foram submetidas a reações de amplificação utilizando primer controle e Taq Platinum (Figura 15). Visando melhor comparação entre elas, foram utilizadas para o teste as duas amostras de DNA dos blocos do arquivo, duas amostras de DNA dos blocos Merck, uma amostra de DNA de tecido fresco extraído com o kit Arcturus, uma amostra de DNA de tecido fresco extraído com o kit da Qiagen e uma amostra de DNA extraído de sangue, usado como controle da reação.

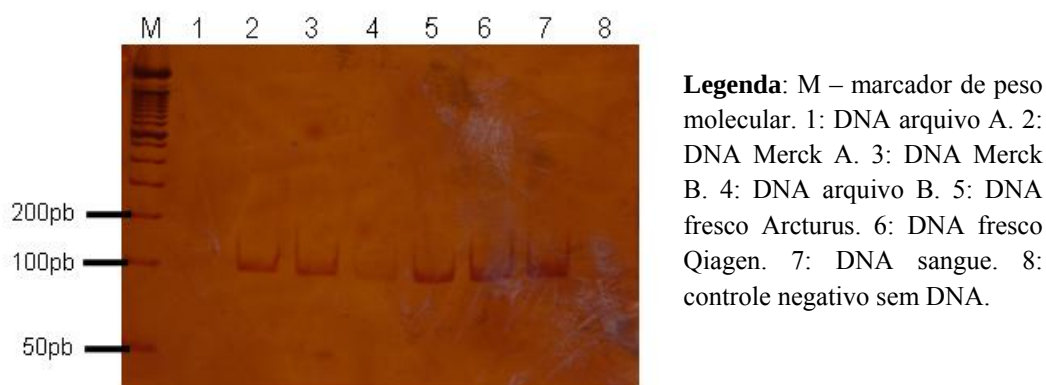


Figura 15 - Teste do kit Pico Pure.

O resultado mostra que as amostras extraídas de blocos com Formalina Merck, dos tecidos frescos e de sangue apresentaram amplificação. Dentre as amostras do arquivo, canaleta número um não apresenta banda e a canaleta número quatro apresenta uma banda fraca.

O kit acima testado forneceu boa quantificação no NanoDrop ND-1000, entretanto, com razões de pureza ruins. Na tentativa de melhorar os resultados, as amostras foram purificadas com clorofórmio. A quantidade de DNA recuperada foi

ainda menor do que as primeiramente obtidas com o kit da Qiagen (entre 1,7 e 3,2 ng/ μ l). Assim, tais amostras não foram utilizadas para testes subseqüentes.

O segundo protocolo de extração que foi paralelamente testado é um protocolo modificado fornecido pelo Dr. David Sidransky Deportas, do *Johns Hopkins University*, mais rápido do que o original, descrito a seguir:

1. Coletar 4 ou 5 cortes de 5 μ m (10-30 μ m) em um tubo de 1,5 ml.
2. Adicionar 1 ml de xilol. Agitar por inversão. Incubar por 5 minutos a 57°C.
3. Centrifugar por 10 min a 12.000 rpm. Remover o sobrenadante com a pipeta.
4. Repetir o procedimento. Descartar o xilol em lixo orgânico.
5. Adicionar 500 μ l de EtOH 100% à amostra. Homogeneizar por inversão até dissolver o pellet.
6. Centrifugar por 15 min a 13.500 rpm. Remover o sobrenadante com a pipeta.
7. Repetir o procedimento com EtOH 70% e EtOH 50%.
8. Ressuspender em 200 μ l Tampão de Digestão:
 - 10 μ l de 0,5M EDTA
 - 5 μ l sodium dodecylsulphate 20%
 - 5 μ l NaCl 4M
 - 2 μ l Tris-HCl 1M pH 8,0
 - 8 μ l Proteinase K 10 μ g/ μ l
 - 170 μ l de água MilliQ
9. Passar parafilme e incubar a 52°C em agitação (700rpm) por 18 horas.
10. Adicionar mais 4 μ l de Proteinase K, caso o tecido não tenha dissolvido por completo.
11. Centrifugar o tubo *Phase Lock Gel* (PLG) por 1 min a 13.500 rpm para que toda a resina desça para o fundo.
12. Transferir a amostra para o tubo PLG. Adicionar 300 μ l de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico
13. Homogeneizar por inversão por 1 min. Centrifugar por 10 min a 13.500 rpm.

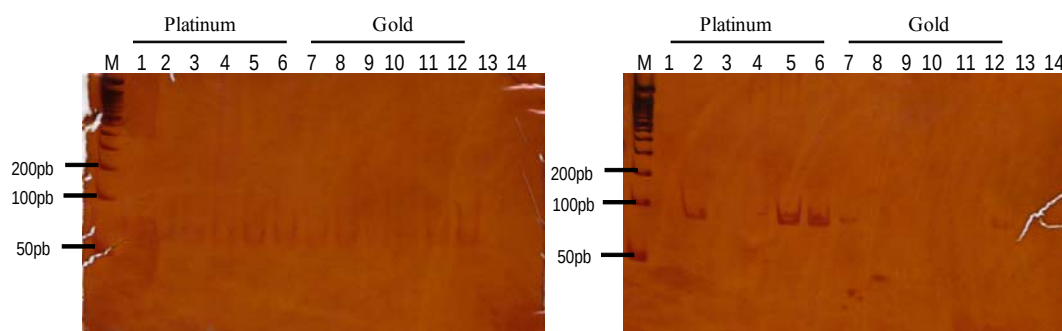
14. Transferir a fase aquosa (acima da resina do tubo) para um novo tubo PLG. Adicionar 300 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Homogenizar. Centrifugar por 10 min a 13.500 rpm.
15. Transferir a fase aquosa para um novo tubo. Adicionar 300 µl de clorofórmio.
16. Homogenizar por inversão por 1 min. Centrifugar por 10 min a 13.500 rpm.
17. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar 0,5 µl de glicogênio (20 mg/ml), 100 µl de acetato de amônio 7.5M e 800 µl de EtOH 100 % gelado. Homogeneizar bem por inversão.
18. Incubar por 2 horas a -80°C.
19. Centrifugar por 30 min a 12.000 rpm a 4°C.
20. Remover o sobrenadante.
21. Lavar o pellet 3x com 1 ml de EtOH 70% gelado. Não é necessário ressuspender o pellet.
22. Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm a 4°C.
23. Remover o sobrenadante (retirar o excesso com a pipeta). Secar o pellet a 42°C.
24. Incubar a 55°C por 10 minutos.
25. Ressuspender em 36 µl de H₂O. Deixar *overnight* a 4°C.
26. Quantificar o DNA. Avaliar integridade com 0,5 µg em gel de agarose ou por PCR (β-actina – intron).
27. Armazenar em freezer -20°C.

Para testar o protocolo acima, utilizou-se quatro amostras: duas do arquivo anteriormente testadas, a Merck B também anteriormente testada e outra amostra de arquivo de outra instituição que continha maior quantidade de tecido emblocado (bloco arquivo C). Após a extração as amostras foram quantificadas no NanoDrop ND-1000. O resultado é mostrado a seguir:

Amostra	[DNA]	A260/A280	
1) bloco arquivo A	→ 22,3 ng/µl	→ 2,19	→ 5 cortes
2) bloco Merck B	→ 10 ng/ µl	→ 2,08	→ 2 cortes
3) bloco arquivo B	→ 31,8 ng/ µl	→ 1,92	→ 5 cortes
4) bloco arquivo C	→ 135,9 ng/ µl	→ 1,72	→ 5 cortes

De acordo com o resultado, o número de cortes utilizados para a extração interfere significativamente na quantidade de DNA final obtida, já que a menor quantidade de DNA obtida é resultante também do menor número de cortes utilizados, bem como a maior quantidade de DNA obtida é resultante de maior número de cortes e com maior tamanho de tecido no bloco.

Além disso, a razão de pureza A260/A280 apresentou-se mais próxima do ideal de 1,8 em relação às amostras extraídas com o kit anterior (Arcturus). Dessa maneira, já que os primers de MSI são mais sensíveis e o grau de pureza foi melhor, decidiu-se testar a amplificação dos DNAs das amostras acima com um primer controle e o BAT26. Dado que em tentativas anteriores a Taq Gold não haviam funcionado, decidiu-se testar nova alíquota recém adquirida juntamente com a Taq Platinum. A Figura 16 mostra o resultado da amplificação.



Legenda: M – marcador de peso molecular. **A:** Gel com as reações com o primer BAT26. 1 a 6: Taq Platinum. 7 a 12: Taq Gold. **B:** Gel com as reações com o primer controle. 1 a 6: Taq Platinum. 7 a 12: Taq Gold. Amostras seguem mesma ordem em ambos géis. 1 e 7: DNA arquivo A. 2 e 8: DNA Merck B. 3 e 9: DNA arquivo B. 4 e 10: DNA arquivo C. 5 e 11: fresco Qiagen. 6 e 12: fresco Arcturus. 13: controle negativo Platinum. 14: controle negativo Gold.

Figura 16 – Teste de amplificação das amostras.

O resultado do Gel A mostra que todas as amostras utilizadas para amplificação com o BAT26 apresentam amplificação, ainda que pouco intensa, mesmo com a Taq Gold que não funcionara anteriormente. É possível que tenha sido um problema com o lote da Taq Gold anterior, dúvida que foi reportada ao fabricante para as devidas providências.

O resultado do Gel B mostra que apenas as amostras Merck B e dos tecidos frescos apresentaram amplificação. As três amostras de parafina do arquivo utilizadas não apresentam amplificação. Este resultado corresponde apenas para a Taq Platinum, pois com a Taq Gold apenas uma das amostras controle de tecido fresco apresentou amplificação. Uma possível explicação para o fato seria uma maior sensibilidade desta enzima.

Com os resultados em relação ao primer controle apresentados satisfatoriamente apenas para amostras Merck e de tecido fresco, amostras que se espera ter DNA menos fragmentado, surgiu a hipótese de que o primer testado não seria um bom controle para amostras de parafina, pois o gene pode se apresentar pouco expresso. Assim, foi utilizado um primer intrônico do gene β -actina, já usado para verificar a integridade do DNA extraído com este protocolo. As reações foram feitas utilizando-se as mesmas amostras de DNA anteriormente testadas e Taq Platinum (Figura 17).

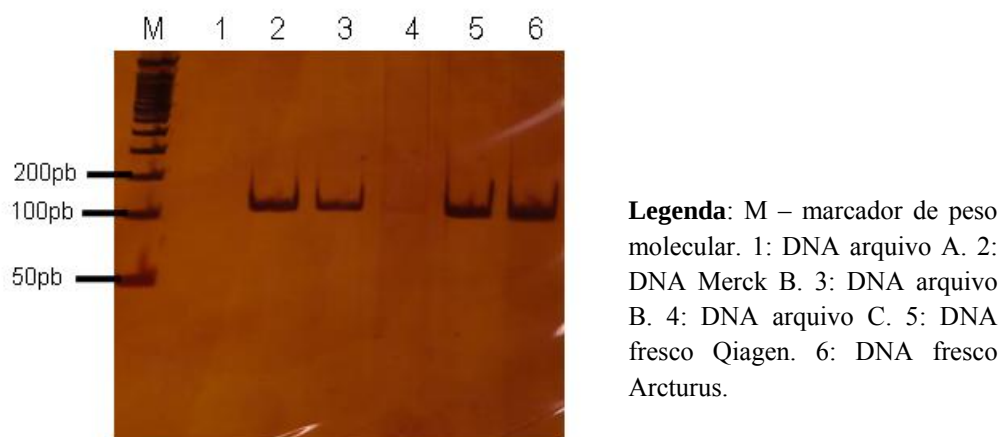


Figura 17 – Teste de amplificação das amostras.

O resultado mostra que com este primer a amplificação melhora, tanto em relação à intensidade quanto em relação às amostras, já que ao menos neste caso uma das amostras de parafina apresentou boa amplificação (DNA arquivo B).

A terceira tentativa de extração que foi testada em paralelo foi o próprio protocolo fornecido pelo Dr. David Sidransky, do Johns Hopkins University, sem as modificações que diminuem o tempo de extração, descrito a seguir:

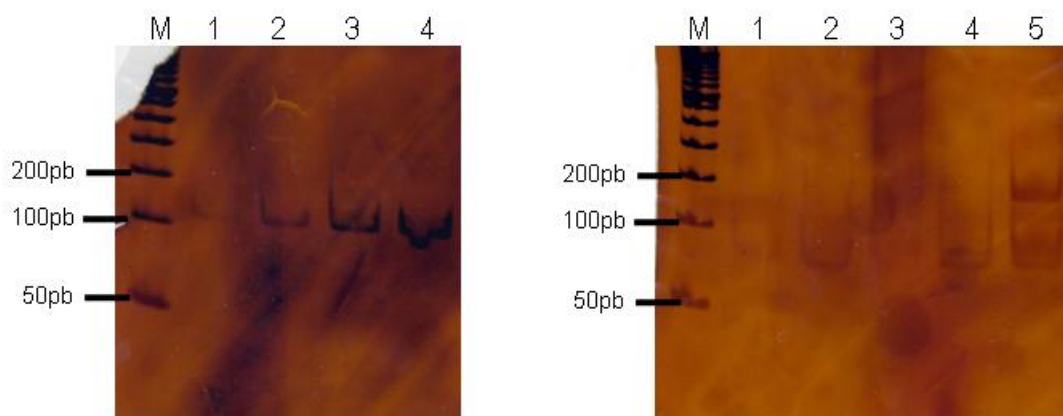
1. Raspar 10 cortes de 5 μ m e adicionar 750 μ l de xilol
2. Incubar as amostras por 2 horas a 48°C
3. Centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm
4. Retirar o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta
5. Adicionar 500 μ l de etanol 100% e homogenizar por inversão. Centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm. Retirar o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta
6. Adicionar 500 μ l de etanol 70% e homogenizar por inversão. Centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm. Retirar o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta
7. Adicionar 500 μ l de etanol 50% e homogenizar por inversão. Centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm. Retirar o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta
8. Preparar solução SDS-PK 1% (proteinase K). Adicionar 300 μ l de SDS-PK 1% e incubar a 48°C por 48 horas
9. Adicionar 5 μ l de PK 20% a cada 8 horas

10. Adicionar 300 µl de fenol-clorofórmio pH 8,0 e vortexar
11. Transferir para tubos Phase-Lock Gel, previamente centrifugados por 30 segundos
12. Centrifugar as amostras por 10 minutos a 13000 rpm
13. Transferir a fase aquosa para novos tubos
14. Adicionar 750 µl de etanol 100% gelado, 100 µl de acetado de amônio 7,5M e 2 µl de glicogênio 20 mg/ml
15. Homogeneizar por inversão
16. Precipitar overnight a -20°C
17. Centrifugar por 30 minutos a 12000 rpm a 4°C
18. Descartar o sobrenadante vertendo o tubo
19. Secar o pellet a temperatura ambiente com o tubo virado de boca pra baixo
20. Ressuspender o pellet em 30 µl de H₂O
21. Deixar as amostras a 4°C overnight para re-hidratar o DNA
22. Quantificar e estocar a -20°C

Para os testes foram utilizadas duas amostras anteriormente testadas, dentre estas, uma do arquivo e outra confeccionada com formalina Merck, e duas novas amostras recentes do arquivo, pois as anteriores deveriam ser preservadas para uso no projeto. Após a extração as amostras foram quantificadas no NanoDrop ND-1000. O resultado é mostrado a seguir:

Amostra	[DNA]	A260/A280	
1) bloco arquivo C	→ 521 ng/µl	→ 1,81	→ 10 cortes
2) bloco arquivo D	→ 132 ng/ µl	→ 1,88	→ 10 cortes
3) bloco arquivo E	→ 760 ng/ µl	→ 1,94	→ 9 cortes
4) bloco Merck A	→ 31,7 ng/ µl	→ 1,78	→ 2 cortes

As amostras foram amplificadas utilizando primer de β -actina intrônico com Taq Platinum, e primer de MSI D17S250 com Taq Gold. As Taqs utilizadas foram as que melhor forneceram resultados para cada primer (Figura 18).



Legenda: M – marcador de peso molecular. **A:** Gel com as reações com o primer β -actina. **B:** Gel com as reações com o primer D17S250. Amostras seguem mesma ordem em ambos géis. 1: DNA arquivo C. 2: DNA arquivo D. 3: DNA arquivo E. 4: DNA Merck A. 5: DNA fresco Qiagen.

Figura 18 – Teste de amplificação das amostras.

O resultado do Gel A mostra que todas as amostras apresentam amplificação, ainda que em graus diferentes.

O resultado do Gel B mostra bandas pouco intensas para todas as amostras, com exceção da amostra de DNA do arquivo E, que embora tenha apresentado amplificação satisfatória com o primer de β -actina, reação realizada concomitantemente, neste gel apresentou padrão de amostra de DNA degradado. Conforme já visto e, portanto, esperado, a amostra de tecido fresco apresenta duas bandas.

Devido a pouca intensidade das bandas apresentadas nos géis quando se utilizavam primers de MSI, decidiu-se testar uma alteração no ciclo de termociclagem das reações de PCR conforme sugerido no curso fornecido pela

empresa Applied Biosystems (Califórnia, Estados Unidos). Visando aumentar a estabilidade da Taq Gold utilizada, de forma que sua eficiência seja mantida do começo até o final dos ciclos da PCR, a ciclagem foi ajustada para ter uma temperatura de denaturação das fitas de 95°C nos primeiros 10 ciclos e temperatura de 89°C nos últimos 20 ciclos.

A reação de PCR modificada foi realizada seguindo as mesmas condições da reação anterior. O resultado é mostrado na Figura 19.

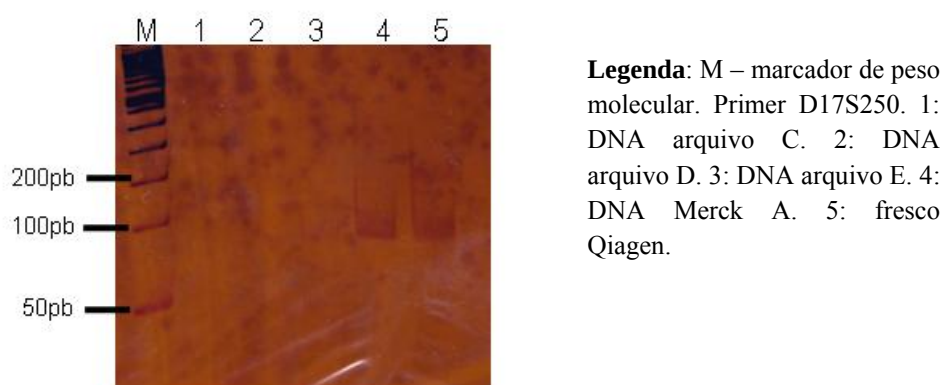


Figura 19 – Teste de amplificação das amostras.

O resultado mostra que não houve melhoras significativas na amplificação com a ciclagem dupla. Tal modificação é sugerida pelo fabricante para evitar um artefato de interpretação que pode ocorrer na análise dos picos mostrados no eletrofluorograma, confundindo picos reais com fragmentos menores de mesma sequência, porém com sua cauda poli-A de tamanho menor. A diferença de temperatura entre os ciclos garante maior estabilidade da Taq polimerase e a homogeneidade de cada fragmento, de forma que a etapa final de poli-adenilação das fitas sintetizadas ocorra mais eficientemente.

Dado que os resultados ainda não se mostravam de forma adequada, decidiu-se testar outro kit de extração de DNA da Qiagen que vem sendo utilizado em medicina forense para extração de amostras escassas.

Amostras de DNA de um paciente oriundas de blocos de parafina correspondentes ao tecido normal de cólon e ao adenocarcinoma foram utilizadas para o teste. A extração de DNA foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Após a desparafinização do tecido raspado da lâmina, o pellet resultante foi pesado em balança analítica para verificação do peso do tecido, antes da incubação para lise das células. Este procedimento foi realizado para não saturar a coluna de extração fornecida com o kit, já que, de acordo com o protocolo fornecido, o kit utilizado permite a extração de DNA de forma eficiente de até 10 mg de tecido. Dessa maneira, utilizou-se a amostra X com 5 µg de tecido e a amostra Y com 9,6 µg de tecido. O DNA eluído da coluna foi quantificado, com resultado mostrado a seguir:

Amostra	[DNA]	A260/A280	
1) bloco arquivo X (adenocarcinoma)	→ 25,7 ng/µl	→ 2,23	→ 2 cortes
2) bloco arquivo Y (mucosa normal)	→ 13,2 ng/ µl	→ 2,31	→ 2 cortes

Estas amostras foram utilizadas para testar se a PCR utilizando os primers de MSI ocorreria de forma satisfatória. Para o teste foram utilizados dois pares de primers, BAT26 e BAT40, dois marcadores mononucleotídicos usados com frequência em literatura (repetição de A e de T, respectivamente). Juntamente com esta amostra de DNA, utilizou-se DNA de tecido fresco de cólon como controle positivo da reação.

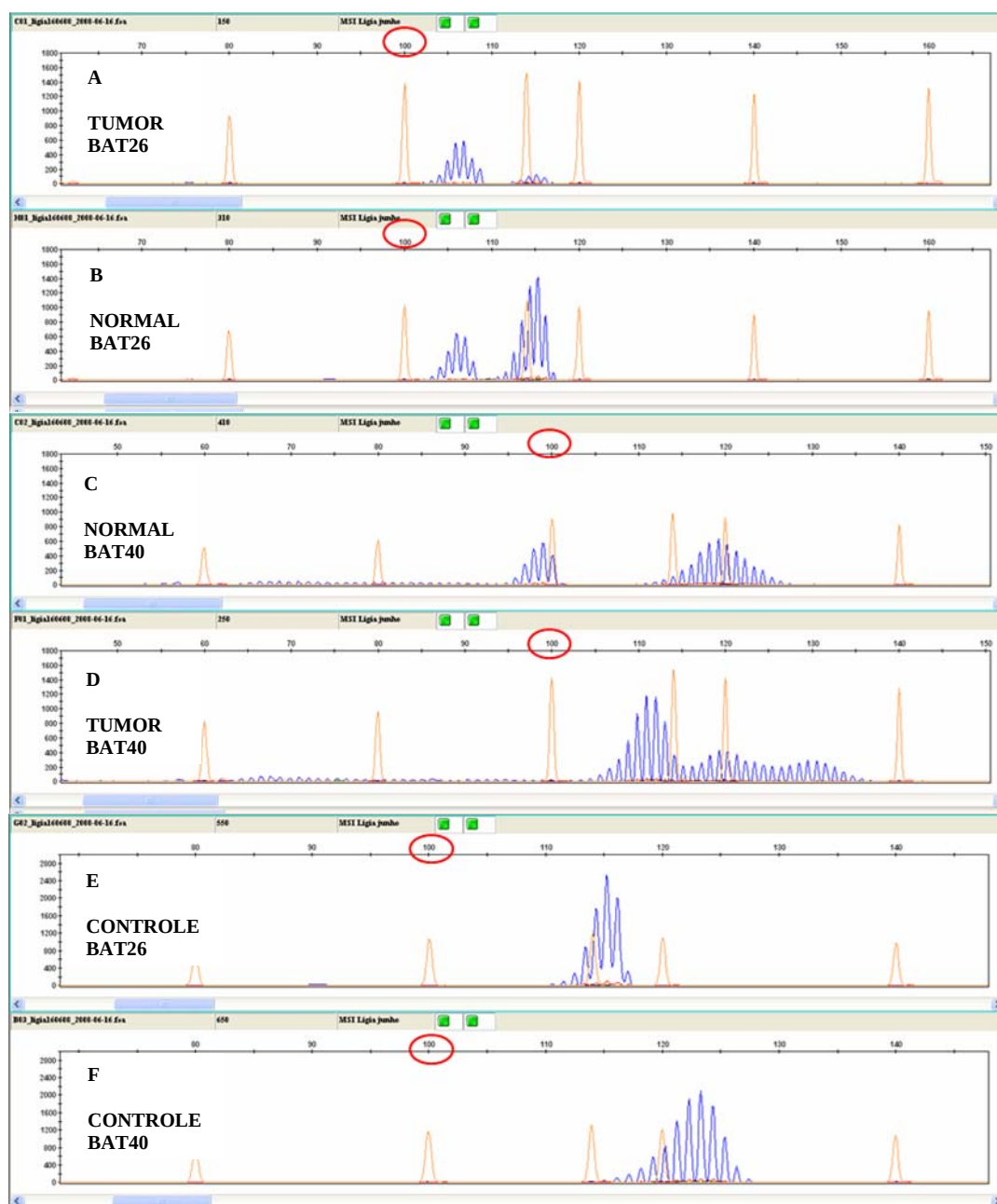
O resultado mostrou bandas fracas acompanhadas de um “arraste” (dados não mostrados). Para verificar se o fragmento de DNA teria sido amplificado neste

padrão, decidiu-se submeter os produtos de PCR à eletroforese no equipamento *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos) para detecção da fluorescência e tamanho dos fragmentos amplificados. Os produtos de PCR foram utilizados na forma concentrada, diluída 10 vezes e diluída 50 vezes. O resultado que forneceu a melhor intensidade de fluorescência variou entre a diluição de 10 e de 50 vezes.

O *Size Standard* consiste em um pool de fragmentos de tamanhos conhecidos marcados com uma fluorescência específica (no caso LIZ) e diferente da usada para identificar o fragmento de interesse no estudo. A solução contendo todos os fragmentos juntamente com todas as amostras é essencial para que o software determine corretamente o tamanho dos picos da amostra analisada.

A corrida demora cerca de 50 minutos a cada injeção, sendo que cada injeção analisa ao mesmo tempo quatro amostras. Os resultados coletados são analisados no software *GeneMapper* (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos), que após a definição dos parâmetros de análise, mostra o eletrofluorograma de cada corrida, seguida dos tamanhos dos alelos encontrados. A análise deve ser feita comparando o padrão do tecido colorretal normal com o padrão do adenocarcinoma. A MSI é verificada quando o tamanho dos alelos mostrado no eletrofluorograma é diferente entre os tecidos correspondentes ao mesmo paciente.

O resultado desta comparação é mostrado a seguir (Figura 20).



Legenda: Os picos azuis correspondem aos fragmentos estudados e os picos laranjas correspondem ao Size Standard. O tamanho circulado em vermelho corresponde a 100 pb, marcado apenas para servir de referência. **A:** picos da amostra X amplificada com BAT26 (adenocarcinoma – C01); **B:** picos da amostra Y amplificada com BAT26 (mucosa normal – H01); **C:** picos da amostra Y amplificada com BAT40 (mucosa normal – C02); **D:** picos da amostra X amplificada com BAT40 (adenocarcinoma – F01); **E:** picos da amostra controle de tecido fresco amplificada com BAT26 (G02); **F:** picos da amostra controle de tecido fresco amplificada com BAT40 (B03).

Figura 20 - Eletrofluorograma derivado do *software GeneMapper*.

O resultado acima mostra que aparentemente foi detectada uma instabilidade entre os eletrofluorogramas A e B e entre C e D (correspondentes às amostras de adenocarcinoma e da mucosa normal), de acordo com o tamanho dos alelos, conforme descrito a Tabela 25 seguir:

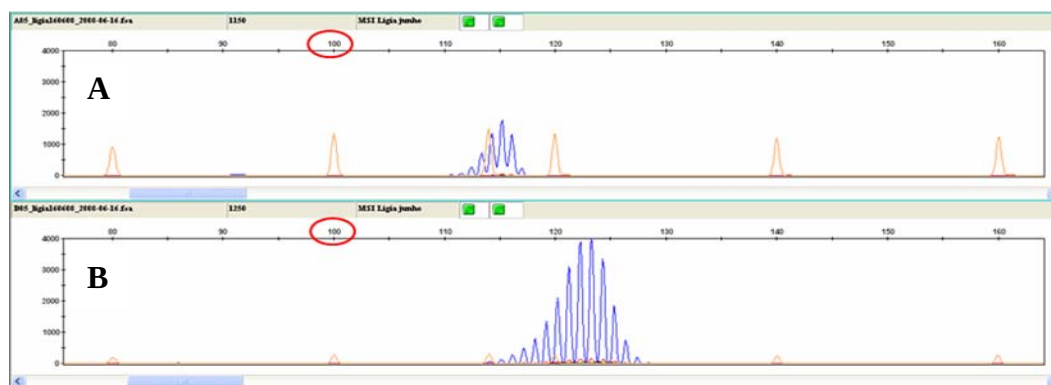
Tabela 25 – Tamanho dos alelos encontrados.

Amostra	Tecido	Primer	Alelo 1	Alelo 2
X	Adenocarcinoma	BAT26	106,74	108,74
Y	Mucosa normal	BAT26	105,96	115,31
X	Adenocarcinoma	BAT40	110,89	113,07
Y	Mucosa normal	BAT40	98,97	119,20

De acordo com a variação de tamanho entre os alelos verifica-se a instabilidade. Entretanto, estes resultados devem ser interpretados com cautela, e neste caso, os dados apresentados são considerados como inconclusivos. O padrão apresentado pelas amostras normais analisadas em comparação com o controle de tecido fresco utilizado é bastante diferente e não condizente com o esperado. Por se tratar de marcadores mononucleotídicos, o esperado seria encontrar uma faixa única de apresentação de picos no eletrofluorograma das amostras correspondentes a mucosa normal, dentro da faixa de tamanho esperada para cada marcador. Como é possível observar nos resultados A e C da Figura 12, duas faixas de picos são apresentadas, diferentemente do padrão apresentado pelo controle de tecido fresco.

Os picos menores à esquerda (menores em tamanho) do pico maior são artefatos inerentes das amplificações de unidades repetitivas, os picos “*stutter*”. Trata-se de unidades de repetições mais curtas em relação ao alelo principal. Os picos *stutters* são bastante reprodutíveis para determinado alelo amplificado,

conforme é possível verificar na figura correspondente ao controle normal de cólon de tecido fresco submetidos novamente a outra PCR utilizando-se os mesmos primers (Figura 21). O tamanho dos alelos encontrados pelo software foram exatamente os mesmos entre as duas PCRs com a mesma amostra.



Legenda: Os picos azuis correspondem aos fragmentos estudados e os picos laranjas correspondem ao Size Standard. O tamanho circulado em vermelho corresponde a 100 pb, marcado apenas para servir de referência. **A:** picos da amostra controle de tecido fresco amplificada com BAT26 (A05); **B:** picos da amostra controle de tecido fresco amplificada com BAT40 (D05).

Figura 21 - Reprodução dos picos *Stutters*. Eletrofluorograma derivado do software GeneMapper.

Concluindo, até o presente momento não foi possível obter DNA de boa qualidade para a realização do experimento de MSI. Apesar dos problemas enfrentados na tentativa de estabelecer a técnica de MSI na Instituição, um importante benefício resultante deste projeto foi a substituição da formalina anteriormente utilizada para uma formalina de melhor qualidade (Merck), que proporcionará aos pesquisadores que seus projetos subsequentes sejam realizados com sucesso.

Na tentativa de resolver o problema da qualidade do DNA obtido de parafina, buscaram-se os mesmos pacientes no Banco de Tumores de tecido congelado da

Instituição. Foram encontrados 26 pacientes pertencentes ao Registro de Câncer Colorretal Hereditário que possuíam tecido fresco congelado. Mesmo em se tratando de uma pequena amostra, a análise de MSI foi realizada nestes pacientes, nos quais as análises imunoistoquímicas já haviam sido realizadas.

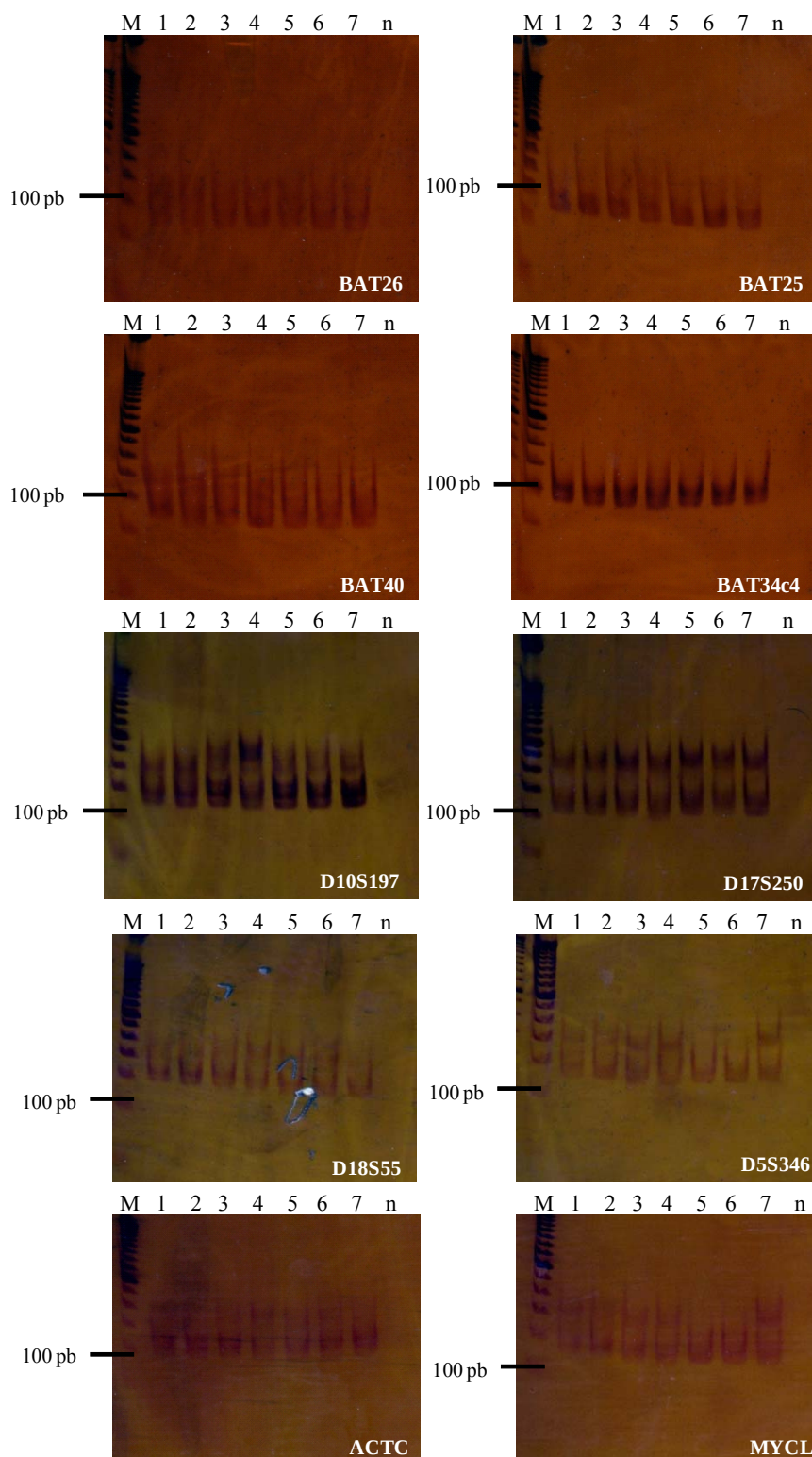
4.2.3 Extração de DNA e Amplificação das Amostras do Banco de Tumores

O DNA das amostras de tecido fresco do Banco de Tumores foi extraído utilizando-se o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as orientações do fabricante. Foram utilizados quatro cortes de 5 µm de cada amostra.

Os DNAs extraídos foram quantificados no NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, Estados Unidos). A quantidade obtida de DNA das amostras apresentou resultados variáveis dependendo do tamanho do tecido, mas sempre com quantidade e qualidade adequadas. Para as reações de PCR todas as amostras foram ajustadas para 20 ng/µl.

Amostras de três pacientes, de mucosa normal e tumoral, foram utilizadas para os testes de amplificação, juntamente com a amostra controle utilizada em todos os testes anteriores, no intuito de verificar se as reações ocorreriam de forma adequada. Dessa maneira, os resultados a seguir representam as reações que foram realizadas para todos os pacientes analisados.

As reações de amplificação foram feitas da mesma forma conforme já descrito para todos os primers, utilizando-se 20 ng de DNA para cada reação. As figuras a seguir apresentam os resultados da amplificação em géis de acrilamida 0,8% (Figura 22).



Legenda: Cada figura possui o nome do seu marcador: BAT26, BAT40, BAT25, BAT34c4, D10S197, D17S250, D18S55, D5S346, ACTC e MYCL. M = marcador. 1-6 = amostras testadas. 7 = controle positivo. N = controle negativo.

Figura 22 - Amostras de DNA amplificadas com todos os primers.

Os produtos de PCR foram diluídos na proporção 1:30, pois nos testes anteriores os melhores resultados ocorreram entre as proporções 1:10 e 1:50. A eletroforese no equipamento *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos) para detecção da fluorescência e tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada conforme já descrito.

Dos 26 pacientes analisados, 12 deles apresentaram instabilidade em pelo menos um dos marcadores. A Tabela 25 a seguir mostra o resultado dos marcadores.

Tabela 26 – Marcadores instáveis.

Casos	BAT26	BAT40	BAT25	BAT34c4	D10S197	D17S20	D18S55	D5S346	ACTC	MYCL	Alteração
1			X								Ausente
2	X	X									Ausente
3	X	X	X				X	X			MSH2/MSH6
4		X	X	X					X	X	MSH2/MSH6
5			X	X	X	X	X			X	MSH2/MSH6
6	X	X	X	X	X	X		X	X		MSH2/MSH6
7	X	X	X	X	X			X	X	X	MLH1/PMS2
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MSH2/MSH6
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MLH1/PMS2
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MSH2/MSH6
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MLH1
12	?	X	?				X	X		X	MSH2/MSH6

Os dois primeiros casos são classificados como MSI-L, ou seja, possuem instabilidade em até 30% dos marcadores. Os demais casos são classificados como MSI-H, ou seja, possuem mais do que 30% dos marcadores instáveis. Dessa maneira, do total de 26 casos analisados, 53,85% foram classificados como MSS, 38,46% como MSI-H e 7,69% como MSI-L.

O fenótipo MSI-H é encontrado de 85% a 92% dos CCRs associados à Síndrome de Lynch e em 10% a 15% dos CCR esporádicos. A técnica de MSI possui

uma sensibilidade de 93% em detectar deficiências no reparo do DNA em carreadores de mutações patogênicas nas proteínas envolvidas (HENDRIKS et al. 2006A; WANG et al. 2007). Aproximadamente 95% dos casos com MSI-H estão ligados a perda de expressão de MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, enquanto que os 5% restantes devem-se a outras etiologias (BAUDHUIN et al. 2005). BURGART (2005) relata que 100% dos adenocarcinomas relacionados à síndrome possuem MSI. Os casos de tumores com MSS com mutação encontrada são reportados na literatura em uma frequência de 10% (JONG et al. 2004).

Todos os casos classificados como MSS apresentaram expressão protéica normal. Dos 12 casos que apresentaram instabilidade todos os classificados como MSI-H apresentaram alteração em pelo menos uma proteína de reparo. Sete dos casos apresentaram perda de expressão protéica em MSH2 e MSH6, dois em MLH1 e PMS2 e um dos casos apresentou perda de expressão apenas em MLH1. Este último caso apresentou todos os marcadores instáveis e foi encaminhado para outro projeto que verificará se o promotor do gene se encontra hipermetilado. Da mesma forma como os resultados de imunoistoquímica se apresentaram, a frequência de alteração no heterodímero MSH2/MSH6 nos casos MSI-H também foi superior a frequência de alteração no heterodímero MLH1/PMS2 (70% x 20%), caracterizando mais uma vez diferenças apresentadas pela população estudada, representativa da população brasileira.

Do caso 12 não foi possível amplificar os fragmentos para os marcadores BAT26 e BAT25 da amostra de tecido de mucosa colônica normal. Dessa forma, não foi possível verificar se existe instabilidade destes marcadores. Ainda assim, devido ao fato de que a paciente apresentou além dos dois marcadores inconclusivos, quatro

marcadores instáveis e ainda ausência de expressão protéica de MSH2 e MSH6, este caso já pode ser classificado como MSH-H e portador da síndrome de Lynch.

Os marcadores foram considerados instáveis quando houve alteração no tamanho dos fragmentos amplificados comparando o tecido da mucosa colônica normal com o tecido de adenocarcinoma. Os marcadores mostraram tamanhos médios de fragmentos de 114,18 pb para o marcador BAT26; 120,59 pb para o marcador BAT40; 120,18 pb para o marcador BAT25; 128,28 pb para o marcador BAT34c4; 169,23 pb para o marcador D10S197; 154,88 pb para o marcador D17S250; 142,69 pb para o marcador D18S5S; 121,29 pb para o marcador D5S346; 81,15 pb para o marcador ACTC e 180,97 pb para o marcador MYCL. Todos os tamanhos encontrados são condizentes com os PCRs *in silico* realizados no site da Universidade de Santa Cruz, na Califórnia (www.genome.ucsc.edu).

A instabilidade dos marcadores mononucleotídicos é mais informativa para uma real deficiência no Sistema de Reparo do DNA do que a instabilidade dos marcadores dinucleotídicos, isso porque as alterações nas repetições de mais de um nucleotídeo podem também ocorrer devido a erros espontâneos de replicação destas seqüências altamente instáveis (JONG et al. 2004). A instabilidade dos marcadores dinucleotídicos é característica de tumores estáveis ou com pouca instabilidade (BLANES e DIAZ-CANO 2006). Os marcadores mononucleotídicos tendem a ser monomórficos ou quasimonomórficos. Além disso, as repetições dinucleotídicas são menos sensíveis do que as mononucleotídicas em detectar MSI-H. Se apenas os marcadores dinucleotídicos se apresentarem instáveis para dado tumor, existe a recomendação de se testar marcadores mononucleotídicos adicionais. Os marcadores

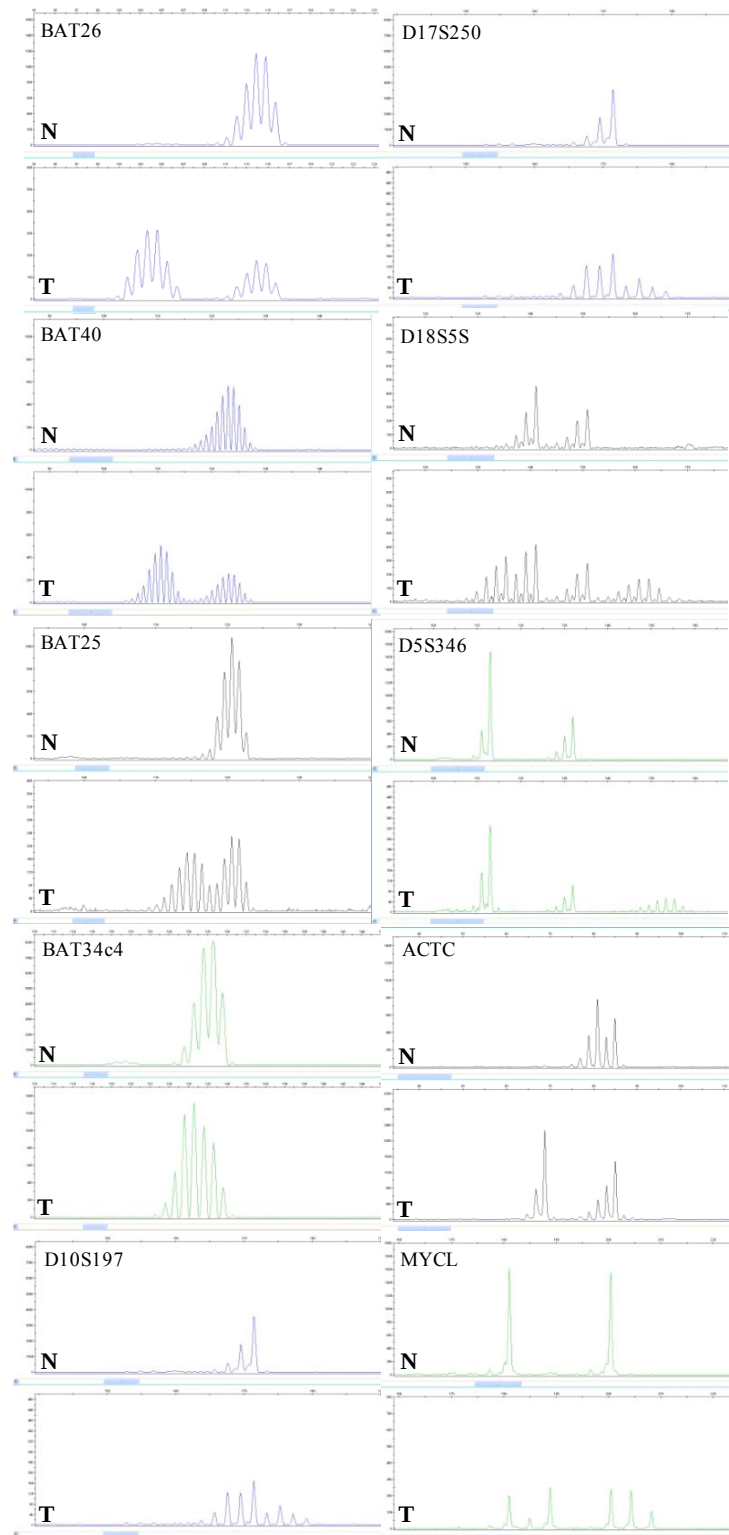
tri-, tetra- ou pentanucleotídicos tendem a ser mais estáveis em tumores com MSI, mas servem como excelentes controles de qualidade (BAUDHUIN et al. 2005).

Para os marcadores dinucleotídicos é freqüente a presença tanto de novos fragmentos maiores quanto menores, devido a expansões e contrações das repetições. Para os marcadores mononucleotídicos, entretanto, fragmentos de tamanho menor são tipicamente detectados (BAUDHUIN et al. 2005).

As mutações em *MLH1*, *MSH2* e *PMS2* levam a uma instabilidade tanto em marcadores mono- quanto dinucleotídicos. Já as mutações em *MSH6* parecem estar mais fortemente associadas com instabilidade nos marcadores mononucleotídicos. Dado que a proteína MSH6 está envolvida no reparo de bases únicas, mas não no reparo de inserção/deleção de loops, é intuitivo que defeitos em *MSH6* resultariam apenas em instabilidade mononucleotídica (BAUDHUIN et al. 2005).

Nas Figuras a seguir (Figuras 23 a 27) são apresentados resultados dos eletrofluorogramas de cinco casos representativos da amostra de estudo. Os picos dos eletrofluorogramas apresentam-se alinhados nas amostras referentes aos tecidos normais e tumorais de cada paciente, de acordo com o tamanho dos alelos encontrados, determinado pelo mesmo *Size Standard* em todas as amostras. Dessa maneira, picos mostrados de forma não alinhada quando comparados em relação às duas amostras do mesmo paciente caracterizam a instabilidade daquele marcador.

O primeiro caso representado na Figura 23 apresenta instabilidade de 10 marcadores e ausência de expressão protéica de MSH2 e MSH6.

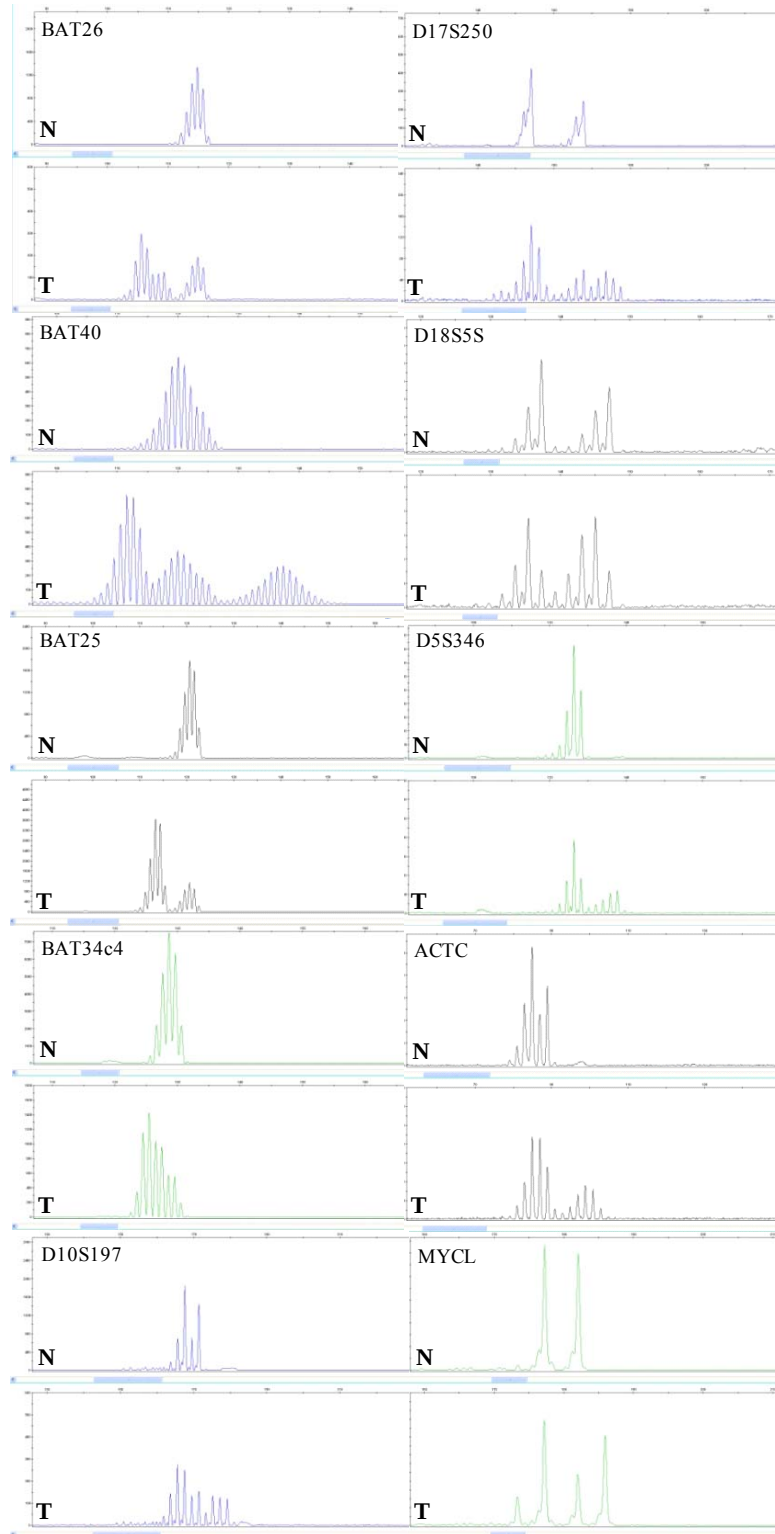


Legenda: Todos os marcadores apresentam-se instáveis. N = mucosa colônica normal (normal); T = adenocarcinoma (tumor).

Figura 23 - Eletrofluorogramas para um caso com perda de expressão protéica de MSH2/MSH6.

O resultado mostrado revela a existência de alelos de tamanhos diferentes no tecido tumoral quando comparados com o tecido normal para todos os marcadores de MSI.

O segundo caso representado na Figura 24 apresenta instabilidade de 10 marcadores e ausência de expressão protéica de MLH1 e PMS2.

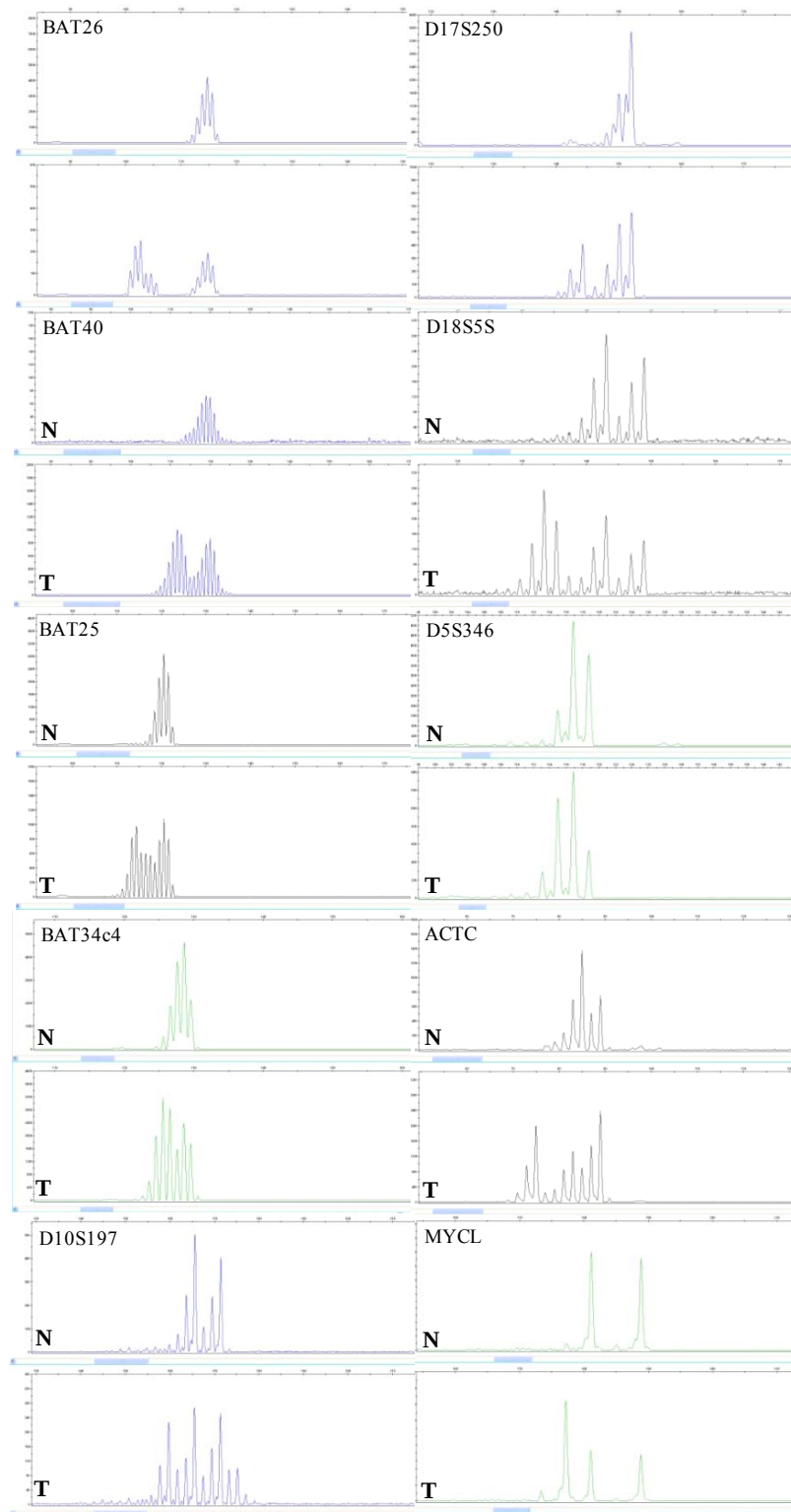


Legenda: Todos os marcadores apresentam-se estáveis. N = mucosa colônica normal (normal); T = adenocarcinoma (tumor).

Figura 24 - Eletrofluorogramas para um caso com perda de expressão protéica de MLH1/PMS2.

O resultado mostrado revela a existência de alelos de tamanhos diferentes no tecido tumoral quando comparados com o tecido normal para todos os marcadores de MSI.

O terceiro caso representado na Figura 25 apresenta instabilidade de 10 marcadores e ausência de expressão protéica apenas de MLH1.

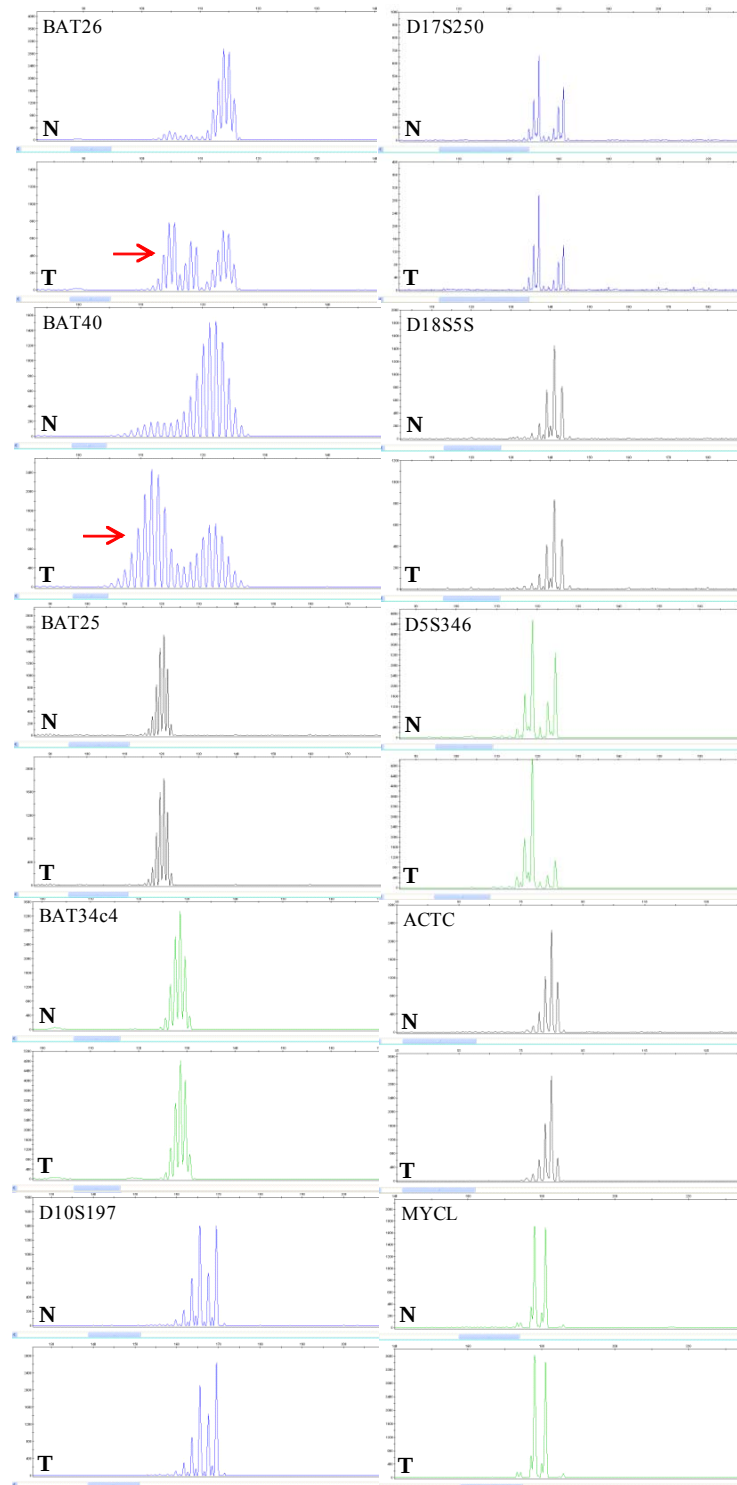


Legenda: Todos os marcadores apresentam-se instáveis. N = mucosa colônica normal (normal); T = adenocarcinoma (tumor).

Figura 25 - Eletrofluorogramas para um caso com perda de expressão protéica apenas para MLH1.

O marcador MYCL apresenta um segundo pico menor em tamanho e menor em intensidade, imediatamente antes do pico maior (alelo amplificado). Trata-se de picos “-A”, resultado do mesmo fragmento com uma base a menos, a adenina, consequência da adenilação ausente ou reduzida que ocorre no período de extensão dos produtos de PCR. Para evitar ou reduzir este efeito o tempo de extensão do ciclo da PCR é aumentado.

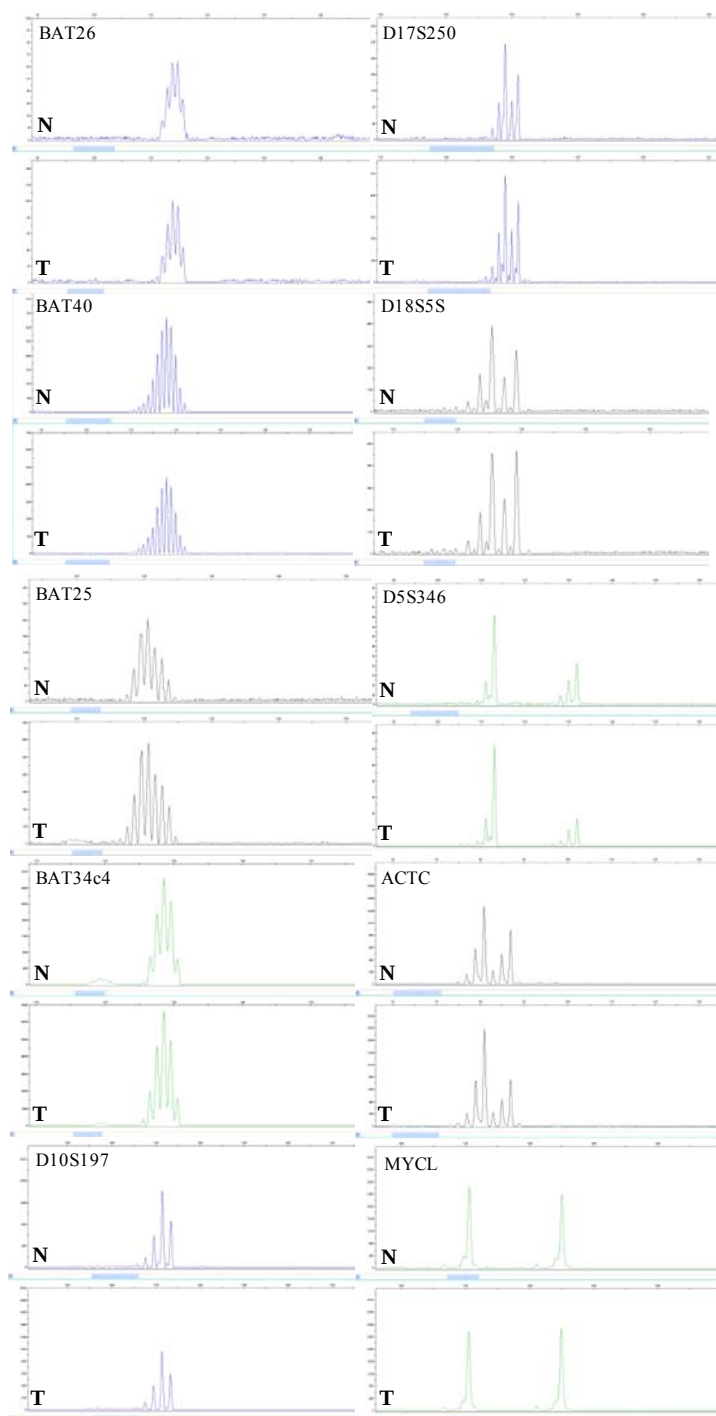
O quarto caso representado na Figura 26 apresenta instabilidade apenas em dois marcadores, BAT26 e BAT40, sendo classificado como MSI-L. A expressão das proteínas de reparo foi normal.



Legenda: Apenas os marcadores BAT26 e BAT40 apresentam-se instáveis (setas). N = mucosa colônica normal (normal); T = adenocarcinoma (tumor).

Figura 26 - Eletrofluorogramas para um caso classificado como MSI-L e sem perda de expressão protéica.

O quinto caso representado na Figura 27 não apresenta instabilidade em nenhum dos marcadores e expressão normal de todas as proteínas estudadas.



Legenda: Todos os marcadores apresentam-se estáveis. N = mucosa colônica normal (normal); T = adenocarcinoma (tumor).

Figura 27 - Eletrofluorogramas para um caso com expressão proteica normal.

O resultado mostrado revela alelos de mesmo tamanho no tecido tumoral quando comparados com o tecido normal para todos os marcadores de MSI. Todas as proteínas estudadas apresentaram expressão normal.

Tumores com MSI apresentam características histológicas semelhantes: 90% estão localizados à direita do cólon, são pouco diferenciados, mucinosos e geralmente têm infiltração por linfócitos T citotóxicos e acúmulo de células B e T ao redor do tumor. Diversas teorias têm sido postuladas para explicar porque tumores MSI-H apresentam melhor prognóstico, apesar das características histológicas desfavoráveis. SAMOWITZ et al. (2001) demonstraram que o valor prognóstico do status de MSI poderia ser significativamente evidenciado pela avaliação combinada com o número de linfócitos citotóxicos ativos intratumoral. Isso deu suporte à hipótese de que tumores MSI-H podem continuamente produzir novos epítomos imunogênicos como consequência de um sistema de reparo defeituoso, o que poderia explicar porque pacientes com câncer colorretal esporádico MSI-H são capazes de apresentar uma resposta imune antitumor mais efetiva, tendo um resultado clínico mais favorável. É possível ainda, que o acúmulo de anormalidades genéticas leve à expressão de proteínas aberrantes, reconhecidas pelo sistema imune culminando com a destruição das células tumorais. Outra teoria relaciona o defeito no sistema de reparo com a melhor sobrevida, pois, uma vez que várias mutações não são reparadas durante a replicação, o acúmulo destas torna-se incompatível com a vida celular (SAMOWITZ et al. 2001).

Pacientes com tumores MSI possuem melhor taxa de sobrevida e respostas modificadas a quimioterapia convencional. A razão para a resposta diferencial pode estar relacionada à distinta cinética celular associada com a subregulação das

proteínas de reparo, aumentando significativamente a apoptose e diminuindo a proliferação celular, o que certamente contribui na resistência das células tumorais à quimioterapia convencional (BLANES e DIAZ-CANO, 2006).

Nos tumores com MSI-H, a deficiência dos genes de reparo pode gerar muitas proteínas truncadas aberrantes por mutações *frameshift*, fornecendo uma fonte anormal de peptídeos que podem ser apresentados aos linfócitos T citotóxicos. O prognóstico favorável pode ser explicado pela marcada infiltração linfocítica vista nos CCRs com MSI-H, que é relacionada especificamente à resposta imune direcionada ao antígeno. Comparando o padrão de expressão gênica de tumores MSI-H e MSS, BANERJEA et al. (2004) mostraram que muitos genes imunomodulatórios importantes, como as moléculas chaperones, citocinas pró-inflamatórias e mediadores citotóxicos são super-regulados em tumores MSI-H, sugerindo uma resposta imune antitumoral ativada nestes tumores. Em relação às análises de expressão de transcritos, KIM et al. (2004) também encontraram genes que são relevantes na discriminação de CCRs MSI-H e MSS, além de uma resposta imune peritumoral intensa relacionada às características fenotípicas de CCRs MSI-H. Estes resultados suportam a hipótese de que os tumores MSI-H possam ser mais imunogênicos do que os MSS.

Os recentes estudos retrospectivos e prospectivos comparando pacientes MSI-H com quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU) e os pacientes sem quimioterapia indicaram que os pacientes com CCR MSS estágio II e III se beneficiam da quimioterapia com 5-FU, enquanto que os pacientes com CCR MSI-H não se beneficiaram (RIBIC et al. 2003). Entretanto, uma análise recente do *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* não atesta o uso de MSI-H como um

marcador preditivo de benefício com a quimioterapia. Estudando linhagens celulares de CCR com deficiência nos genes do sistema de reparo BOLAND et al. (2008) verificaram que as células eram resistentes aos efeitos citotóxicos de muitas drogas, incluindo agentes alquilantes e o 5-FU, sugerindo, desta forma, que pacientes com MSI mostrariam menor benefício com este tipo de tratamento do que os pacientes com MSS. Assim, os dados atuais disponíveis não justificam a exclusão de pacientes com CCR MSI-H para tratamento com 5-FU. Considerando a heterogeneidade molecular do fenótipo MSI em relação com as características genéticas e epigenéticas, pode ser difícil utilizar a MSI-H como um único marcador preditivo para guiar o uso de 5-FU e outras drogas quimioterápicas em pacientes com CCR (IMAI e YAMAMOTO 2008).

VAN RIJNSOEVER et al. (2003) mostraram que CCRs com o fenótipo metilador de ilhas CpGs alta (CIMP+) é um preditor de benefício com quimioterapia com 5-FU independentemente do *status* de MSI. A CIMP+ é caracterizada pela presença de metilação em dois ou mais sítios analisados. A explicação para os achados estão nas ligações demonstradas entre o metabolismo de folato e mudanças na metilação do DNA. A hipótese é de que a hipermetilação observada nos tumores com CIMP+ pode ser um marcador substituto para aberrações generalizadas no metabolismo celular de folato e de grupo metil. Tais mudanças podem render às células tumorais com CIMP+ maior sensibilidade para terapias anti-folato, incluindo 5-FU e ácido folínico. Outra explicação para a aparente quimiosensibilidade de tumores CIMP+ é que o silenciamento transcricional associado com este fenótipo inativaria genes necessários à sobrevivência celular na presença de 5-FU.

A presença e o papel de tumores MSI-L ainda é controversa. A natureza da MSI-L ainda não foi substancialmente caracterizada por defeitos nos genes de reparo do DNA ou outros defeitos. As análises de mutações em genes alvo para a MSI-H revelaram que elas são ausentes nos tumores MSI-L. Os tumores MSI-L são indistinguíveis dos MSS em muitos parâmetros. Dessa forma, acredita-se que estas alterações isoladas de microssatélites não representam indicadores de instabilidade genômica, apesar de serem marcadores úteis de clonalidade ou de atividade mitótica. As mutações observadas em tumores MSI-L podem representar um nível de instabilidade genética presente em todos os tumores e em suas células precursoras normais. Se um número suficiente de marcadores for analisado, todos os tumores além dos MSI-H exibiriam MSI-L, de acordo com o critério de classificação do NCI. É proposto ainda, que a variação de nível de instabilidade encontrada nos CCRs MSI-L são quantitativas e que provavelmente refletem a história evolucionária dos tumores, mais do que diferenças qualitativas nas vias genéticas de tumorigênese (IMAI e YAMAMOTO 2008).

Por outro lado, muitos estudos sugerem que os tumores MSI-L formam uma entidade única, associada à perda de expressão da proteína *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* (MGMT). Assim, a perda de MGMT e de MLH1 devido a metilação, têm sido sugeridos por serem mecanismos para a MSI-L. O silenciamento de *MGMT* favorece mutações nos genes por subjugar o sistema de reparo do DNA (WHITEHALL et al. 2001).

É preciso demonstrar ainda se os tumores MSI-L compõem dois grupos, um indistinguível dos tumores MSS e outro distinto que pode apresentar muitas mutações devido a uma instabilidade baixa ou transiente. O principal problema

reside na dificuldade em estabelecer um critério para a distinção destes possíveis tumores MSI-L “verdadeiros” do restante de tumores MSS ou MSI-L “falsos”, baseado no número de alterações de marcadores dinucleotídicos. Uma possibilidade seria usar especificamente marcadores mononucleotídicos nos tumores MSI-H e descobrir algum marcador dinucleotídico que poderia estar alterado apenas nos tumores MSI-L e não nos tumores MSS (IMAI e YAMAMOTO 2008).

5 CONCLUSÃO

O estudo mostra que os pacientes investigados, representativos da população brasileira, também podem usufruir do estudo imunoistoquímico das proteínas de reparo do DNA, pois também possuem a perda da expressão destas proteínas como marcadores importantes no estabelecimento da síndrome de Lynch.

A realização da técnica de MSI com a quantidade de marcadores adequada para reduzir os casos falso-negativos é comprometida pelo uso de material fixado em formalina que não seja de boa qualidade, mesmo que esta seja tamponada. Este fato foi evidenciado na tentativa de obtenção de DNA das amostras deste serviço, que utiliza formalina tamponada desde 1996, e mesmo assim, não foi possível obter DNA necessário para a realização de MSI.

Dessa forma, a técnica de MSI foi realizada em amostras de tecido congelado oriundas do Banco de Tumores. Houve concordância entre os achados de imunoistoquímica e MSI, ou seja, os casos com MSI-H apresentaram alteração protéica e os casos MSI-L e MSS não apresentaram.

Entre os achados clínicos que apresentaram correlação com a perda de expressão das proteínas de reparo estão a localização do tumor do lado direito do cólon e o tipo histológico de adenocarcinomas com componente mucinoso.

O tumor extra-colônico que foi encontrado nesta casuística entre os familiares com maior frequência em relação aos indivíduos que apresentaram perda da expressão de proteínas de reparo foi o adenocarcinoma de endométrio. No entanto,

com relação aos indivíduos que não apresentaram perda de expressão das proteínas de reparo, o mais freqüente foi o carcinoma de mama.

As técnicas de imunoistoquímica para os genes de reparo do DNA e de instabilidade de microssatélites são ferramentas importantes na identificação de indivíduos com risco elevado de serem portadores da síndrome de Lynch.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter; 2003. Anticorpos e antígenos; p.41-62.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Roberts KR, Walter P. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed; 1999. Sequencias repetitivas de DNA e elemntos transponíveis.

Ashktorab H, Brim H, Al-Riyami M, et al. Sporadic Colon Cancer: Mismatch Repair Immunohistochemistry and Microsatellite Instability in Omani Subjects. **Dig Dis Sci** 2008; Feb 26. [Epub ahead of print]

Averbach M, Borges JLA. Diagnóstico de câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de Cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.63-76.

Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. **Mol Cancer** 2004; 6:21.

Baudhuin LM, Burgart J, Leontovich O, Thibodeau SN. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk foi Lynch syndrome. **Familial Cancer** 2005; 4:255-65.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene** 2001; 20: 4621-8.

Blanes A, Diaz-Cano SJ. Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. **World J Gastroenterol** 2006; 12:5932-40.

Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. **Fam Cancer** 2008; 7:41-52.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:5248-57.

Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. **Fam Cancer** 2005; 4:211-8.

Burgart LJ. Testing for defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma. **Arch Pathol Lab Med** 2005; 129:1385-89.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2008 - Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Carvalho F, Santos EMM, Pena SP, et al. Clinicopathological significance of BAT26 instability in 184 patients with colorectal cancer. **Appl Cancer Res** 2005; 25:36-40.

Case AS, Zigelboim I, Mutch DG, et al. Clustering of Lynch syndrome malignancies with no evidence for a role of DNA mismatch repair. **Gynecol Oncol** 2008; 108:438-44.

Chammas R, Nowak EM. Mecanismos de invasão e metástases em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.55-62.

Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2005; 4:233-7.

Cossio SL, Coura RS, Bortolini MC, Giugliani R, Ashton-Prolla P, Prolla JC. Polymorphic variation of mononucleotide microsatellites in healthy humans and its implication for microsatellite instability screening. **Arq Gastroenterol** 2007; 44:64-7.

Dominguez MV, Bastos EP, Santos EM, et al. Two new MLH1 germline mutations in Brazilian lynch syndrome families. **Int J Colorectal Dis** 2008; Jul 2. [Epub ahead of print]

Dovrat S, Figer A, Fidder HH, et al. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC- like families. **Fam Cancer** 2005; 4:291-4.

Drummond JT, Li GM, Longley MJ, et al. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. **Science** 1994; 268:1909-12.

Eng C, Hampel H, de la Chapelle A. Genetic testing for cancer predisposition. **Ann Rev Med** 2000; 52:371-400.

Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. **Br Med Bull** 2002; 64:27-43.

Felton KE, Gilchrist DM, Andrew SE. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? **Clin Genet** 2007a; 71:499-500.

Felton KE, Gilchrist DM, Andrew SE. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. **Clin Genet** 2007b; 71:483-98.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. **GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide - Version 1.0**. IARC CancerBase n° 5. Lyon: IARCPress; 2001.

Fernandes ERQGS. **Instabilidade de microssatélites por técnicas de biologia molecular em amostras de pacientes jovens com carcinoma colorretal processadas rotineiramente para diagnostico anátomopatológico**. Minas Gerais; 2007. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Minas Gerais].

Ferreira FO, Ferreira CCN, Rossi BM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in HNPCC and familial colorectal cancer Brazilian families. **Fam Cancer** 2004; 3:41-7.

Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. **Cancer Research** 2001; 61:7369-74.

Franco ED, Franco EL. Epidemiologia e fatores de risco em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.3-22.

Fuzikawa AK, Haddad LA, da-Cunha-Melo JR, Brasileiro-Filho G, Pena SD. Utilization of microsatellites for the analysis of genomic alterations in colorectal cancers in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 1997; 30:915-21.

Gatalica Z, Torlakovic E. Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. **Fam Cancer** 2008; 7:15-26.

Giraldo A, Gomez A, Salguero G, et al. MLH1 and MSH2 mutations in Colombian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome)–description of four novel mutations. **Fam Cancer** 2005; 4:285-90.

Goecke T, Schulmann K, Engel C, et al. German HNPCC Consortium. Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. **J Clin Oncol** 2006; 24:4285-92.

Goulart AC, Benseñor IJM, Aguiar Junior S. Prevenção primária e secundária de câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.23-42.

Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. The added value of PMS2 immunostaining in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Fam Cancer** 2006; 5:353-8.

Hansen TP, Nielsen O, Fenger C. Optimization of antibodies for detection of the mismatch repair proteins MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 using a biotin-free visualization system. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2006; 14:115-21.

Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. **CA Cancer J Clin** 2006a; 56:213-25.

Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). **Gastroenterology** 2006b; 130:312-22.

Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. **Carcinogenesis** 2008; 29:673-80.

Jass JR, Young J, Leggett BA. Evolution of colorectal cancer: change of pace and change of direction. **J Gastroenterol Hepatol** 2002; 17:17-26.

Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al. Colon Cancer Family Registry. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. **Gastroenterology** 2007; 133:48-56.

Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev** 2000; 10:157-61.

Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:972-80.

Kim H, Nam SW, Rhee H, et al. Different gene expression profiles between microsatellite instability-high and microsatellite stable colorectal carcinomas. **Oncogene** 2004; 19:6218-25.

Kim JC, Roh SA, Yoon YS, Kim HC, Park IJ. MLH3 and EXO1 alterations in familial colorectal cancer patients not fulfilling Amsterdam criteria. **Cancer Genet Cytogenet** 2007; 176:172-4.

Kirk JA. How can we best detect hereditary non-polyposis colorectal cancer? **Med J Austr** 2006; 184:206-7.

Knudson AGJr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1971; 68:820-3.

Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:291-9.

Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** 2001; 15:860-921.

Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjold M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. **Nat Genet** 1993; 5:279-82.

Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. **J Clin Oncol** 2002; 15:1043-8.

Liu Y, Bodmer WF. Carcinogênese colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.43-54.

Lynch HT, Lynch PM. Molecular screening for the Lynch syndrome--better than family history? **N Engl J Med** 2005; 352:1920-2.

Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:261-3.

Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1308-14.

Morrison AS. Screening. In: Rothman KJ, Greenland S. **Modern epidemiology**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1998. p.499-518

Müller A, Beckmann C, Westphal G, et al. German HNPCC Consortium. Prevalence of the mismatch-repair-deficient phenotype in colonic adenomas arising in HNPCC patients: results of a 5-year follow-up study. **Int J Colorectal Dis** 2006; 21:632-41.

Müller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, et al. ICG-HNPCC (International Collaborative Group). The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) - results of an international collaborative study. **Fam Cancer** 2001; 1:87-92.

Nash GM, Gimbel M, Shia J, et al. Automated, multiplex assay for high-frequency microsatellite instability in colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2003; 15:3105-12.

Nilbert M, Wikman FP, Hansen TV, et al. Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. **Fam Cancer** 2008; Jun 20. [Epub ahead of print]

Palombo F, Gallinari P, Iaccaraino I, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science** 1995; 268:1912-4.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. **Cancer Incidence in Five Continents vol. Viii**. Lyon: IARC; 2003. 155:110-13.

Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science** 1993; 260:810-2.

Peltomäki P. Lynch syndrome genes. **Fam Cancer** 2005; 4:227-32.

Pinho M. Marcadores tumorais em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.87-104.

Plaschke J, Krüger S, Pistorius S, Theissig F, Saeger HD, Schackert HK. Involvement of hMSH6 in the development of hereditary and sporadic colorectal cancer revealed by immunostaining is based on germline mutations, but rarely on somatic inactivation. **Int J Cancer** 2002; 97:643-8.

Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. **Histopathology** 2007; 50:151-62.

Redston M. Epithelial Neoplasms of the Large Intestine. In: Odze RD, Goldblum JR, Crawford JM, editors. **GI tract, liver, biliary tract, and pancreas**. China: Saunders; 2004. p.441-72.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N Engl J Med** 2003; 17:247-57.

Rossi BM, Lopes A, Ferreira FO, et al. *hMLH1* and *hMSH2* gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2002; 6:555-61.

Rossi BM, Silva AMS. Resultados de tratamento de câncer de cólon. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.255-61.

Rossi BM, Pinho MSL, Nakagawa WT, et al. Tumores colorretais hereditários. **Rev Col Bras Cir** 1998; 25:271-80.

Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CT, Nonogaki S, Pinto GA. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editores. **Manual de imunohistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999. p.237-59.

Sakurai M, Zhao Y, Oki E, Kakeji Y, Oda S, Maehara Y. High-resolution fluorescent analysis of microsatellite instability in gastric cancer. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2007; 19:701-9.

Sambrook J, Russel DW. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. Appendix 8: Commoly used techniques in molecular cloning, v.3; p.A8.20.

Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:917-23.

Sarroca C, Alfano N, Bendin GT, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome II) in Uruguay. **Dis Colon Rectum** 2000; 43:353-62.

Sarroca C, Della Valle A, Fresco R, Renkonen E, Peltomäki P, Lynch HT. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer among Uruguayan patients with colorectal cancer. **ClinGenet** 2005; 68:80-7.

Sarroca C, Peltomäki P, Alfano N, et al. Three new mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome II) in Uruguay. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 142:13-20.

Sohn DK, Chang HJ, Park JW, et al. Histopathological risk factors for lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal carcinoma of pedunculated or semipedunculated type. **J Clin Pathol** 2007; 60:912-5.

Speights VO, Johnson MW, Stoltenberg PH, Rappaport ES, Helbert B, Riggs M. Colorectal cancer: current trends in initial clinical manifestations. **Sout Med J** 1991; 84:575-8.

Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. **Cancer Res** 1998; 58:1713-8.

Urso E, Pucciarelli S, Agostini M, et al. Proximal colon cancer in patients aged 51-60 years of age should be tested for microsatellites instability: a comment on the Revised Bethesda Guidelines. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23:801-6.

Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 1:2898-903.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum** 1991; 34:424-5.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Vasen HFA. Clinical description of Lynch síndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. **Fam Cancer** 2005; 4:219-25.

Wang J, Luo MH, Zhang ZX, et al. Clinical and molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Chinese colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol** 2007; 13:1612-7.

Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA, Jass JR. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. **Cancer Res** 2001; 61:827-30.

ANEXOS

Anexo 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução N. 196/96 e resolução CNS 252/97 do Ministério da Saúde)

PROJETO: AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES DO SISTEMA DE REPARO DE DNA EM PACIENTES COM SUSPEITA DE CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE: ESTUDO COLABORATIVO SUL-AMERICANO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: _____

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n.: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento: _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ TEL: _____

RESPONSÁVEL: _____

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n.: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento: _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ TEL: _____

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

Você foi convidado a participar deste estudo, pois sua família pode ser portadora de uma síndrome hereditária de câncer do intestino grosso. Isto significa que os indivíduos de sua família podem ter risco aumentado de desenvolver câncer do intestino grosso. Este risco aumentado pode ser consequência de alteração nos genes.

Este estudo tem por objetivo verificar se indivíduos que pertencem a famílias com câncer colorretal hereditário sem polipose têm alterações nos genes MLH1 e MSH2.

A maioria dos tumores de intestino grosso é esporádica, ou seja, sem história familiar. Porém, entre 5% a 10% dos casos (ou um em cada 10 tumores do intestino grosso), são chamados hereditários, pois são causados por alterações nos genes chamadas mutações.

Os genes são códigos dentro das células que funcionam como programas que determinam como as células do organismo devem funcionar. Quando ocorrem as alterações chamadas mutações, os genes podem não funcionar direito e enviar sinais errados para o funcionamento das células. Quando as mutações ocorrem em genes que atuam no crescimento das células, isto pode levar ao desenvolvimento de tumores.

Existem diversas doenças hereditárias que aumentam o risco de câncer do intestino grosso, dentre elas está o HNPCC (câncer colorretal hereditário sem polipose). Para o diagnóstico da doença HNPCC há um critério clínico (características baseadas na história familiar) e o diagnóstico molecular (feito através de um exame de sangue específico). Quando indivíduos de famílias com diagnóstico do HNPCC baseado na história familiar realizam o exame de sangue, é possível em 60% dos casos encontrar alterações em um dos seis genes identificados até o momento. Dois, destes seis genes (chamados MLH1 e MSH2) são responsáveis pela maioria das alterações.

III. PROCEDIMENTOS

Após a assinatura deste consentimento (autorização para o estudo), você realizará uma entrevista com a enfermeira que irá explicar todos os procedimentos. A história de câncer da

sua família será revisada. Ao terminar esta entrevista, você será encaminhado ao laboratório para a retirada da amostra de sangue. No laboratório serão retirados 20ml de sangue (aproximadamente duas colheres de sopa) através de uma agulha colocada no seu braço. O sangue será colocado em dois tubos, identificado e enviado ao laboratório para análise. No laboratório, o sangue passará por uma máquina que irá verificar se dois genes, o hMLH1 e o HMSH2 têm alguma alteração. Essas alterações são chamadas mutações.

Além de avaliar o seu sangue, iremos avaliar um pedaço do tumor que foi retirado na sua cirurgia e está guardado no arquivo do hospital. É possível que algumas das alterações observadas nos genes retirados do seu sangue possam estar presentes no tumor. Estas alterações são chamadas de instabilidade de microssatélites.

Uma vez que os testes estiverem prontos, você será comunicado por telefone e deverá marcar uma consulta com o médico que solicitou o exame.

Quando o resultado estiver pronto, você receberá um contato por telefone para agendar uma consulta de retorno. Nesta consulta será divulgado o resultado, e serão discutidas as implicações do teste sobre o risco de câncer do intestino grosso. Você pode se recusar a receber o resultado.

Existem três possibilidades de resultados:

1 – você pode ter a alteração nos genes MLH1 e MSH2 que está associada a um maior risco de câncer de intestino grosso; é o que chamamos de resultado positivo; se você tem a alteração no gene, tem 50% de chance de passar a alteração para os seus filhos. O fato de ter alteração não significa que a pessoa irá ter câncer. Um indivíduo com alteração em um dos genes examinados tem entre 20 a 80% de risco de desenvolver câncer do intestino grosso durante toda a vida. Algumas pessoas com a alteração genética não têm câncer. Uma pessoa que tem a alteração pode realizar acompanhamento para detectar o câncer. Este acompanhamento consiste de colonoscopia, endoscopia, ultrassonografia do abdome e exame de urina anuais;

2 – o exame não identificou alterações nos genes MLH1 e MSH2. Isto é chamado de resultado inconclusivo. Isto pode ocorrer em duas situações: você tem alterações em outros genes que não foram estudados, ou o teste de laboratório utilizado não conseguiu encontrar a alteração; os indivíduos com teste inconclusivo devem prosseguir com os exames de seguimento;

3 – o exame encontrou uma alteração que não é possível determinar se ela está associada a um risco maior de câncer.

O resultado será divulgado apenas para você. Você pode optar, em qualquer momento do estudo, a não saber do resultado dos exames. A decisão de contar aos seus familiares é sua. Os seus familiares podem se beneficiar com esta informação, pois podem programar com que frequência os exames de seguimento podem ser realizados. O seu teste não terá custo.

IV - BENEFÍCIOS

A participação estudo pode não trazer benefícios para você ou para os membros de sua família; mas pode ajudar os médicos a compreender como o câncer se desenvolve. Se o teste mostrar que você tem alteração no gene, isto pode auxiliar o médico nas orientações que serão fornecidas sobre os exames preventivos.

V - RISCOS

Os riscos associados com sua participação nesse estudo são dor ou queimação no local da retirada do sangue.

Além disso, o teste pode causar alterações psicológicas. Ao saber sobre o seu risco de câncer devido alterações nos genes você poder sentir aumento na ansiedade, ou raiva, ou medo do futuro.

Confidencialidade:

A confidencialidade das suas informações será mantida. Apenas as pessoas envolvidas diretamente nesse estudo poderão inspecionar as informações se necessário. Cada família e cada indivíduo inserido na família terá um número identificador para manter a privacidade. Esse número será o meio pelo qual você será identificado. Seu nome e informações pessoais não serão incluídos em nenhum estudo de pesquisa que possa fazer uso de seu sangue e/ou de pedaço de tecido.

A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento. Sua recusa ou desistência não irá prejudicar o tratamento.

A identidade dos pacientes será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e da Comissão de Ética terão acesso aos registros.

Qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a enfermeira Erika no telefone 2189 5000 ramal 2304. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer – SP, pelo telefone 21895000, ramais 1113 ou 1117.

Declaro que fui esclarecido: sobre os procedimentos, riscos e benefícios sobre este estudo; que tenho liberdade em retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo a continuidade do meu tratamento; que não haverá remuneração financeira para este estudo; sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial e concordo em participar deste estudo.

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Assinatura do paciente ou responsável/representante local

Assinatura do pesquisador ou representante

Anexo 2 – Ficha de Dados

PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER COLORRETAL: DADOS CLÍNICOS, HISTÓRIA FAMILIAR E INVESTIGAÇÃO FAMILIAR.

Família (RCCH)			
Classificação segundo história familiar	S	N	Ign
HNPCC (Amsterdam I).....	☐ ☐ ☐		
HNPCC (Amsterdam II).....	☐ ☐ ☐		
Bethesda.....	☐ ☐ ☐		
Padrão Familiar.....	☐ ☐ ☐		
SMOH.....	☐ ☐ ☐		
Mama-cólon.....	☐ ☐ ☐		
Síndrome Li-Fraumeni	☐ ☐ ☐		
Síndrome Li-Fraumeni like	☐ ☐ ☐		
Outra	☐ ☐ ☐		
Data de inclusão no estudo			
Identificação do estudo			
Identificação PINGA			
Tubo de sangue _____			
Tubo de leucócito _____			
Tubo de DNA _____			
Dados do Probando			
Nome			
RGH			
Sexo	(1) Masculino	(2) Feminino	
Data de nascimento			
Data de admissão			
Tumores	S	N	Idade
Colorretal (exceto adenomas).....	☐ ☐		_____
Adenomas colorretais.....	☐ ☐		_____
Endométrio	☐ ☐		_____
Estômago.....	☐ ☐		_____
Sistema hepatobiliar.....	☐ ☐		_____
Intestino delgado.....	☐ ☐		_____
Pelve renal e/ou ureter	☐ ☐		_____
Ovário	☐ ☐		_____
Pâncreas	☐ ☐		_____
SNC.....	☐ ☐		_____
Sebáceos.....	☐ ☐		_____
Mama	☐ ☐		_____
	☐ ☐		_____
Número de tumores malignos primários			
Número de tumores benignos primários			

DADOS CLÍNICOS E ANATOMOPATOLÓGICOS DO TUMOR COLORRETAL			
Data do diagnóstico do câncer colorretal			
Tumor primário colorretal			
(0) não tem CCR	(1) cólon prox (D+T)	(2) cólon distal (E+S)	(3) reto
(4) adenomas	(9) ignorado		
(0) não	(1) QT	(2) RxT	
Data			
(0) não	(1) colectomia parcial	(2) colectomia total	
(4) RA/APP	(5) Ampliada/Exenteração		
(7) Ressecção aberta/transanal			
(0) não operado	(1) curativa	(2) paliativa	
(0) T0	(1) T1	(2) T2	
(4) T4	(9) Tx		
(0) N0	(1) N1	(2) N2	
(0) M0	(1) M1 retroperitônio	(2) M1 fígado	
(0) sem metástase	(1) sim	(2) não	
(1) Bem Diferenciado	(2) moderadamente diferenciado	(3) pouco Diferenciado	
(1) exofítica	(2) endofítica	(3) difusa	
(8) outras	(9) ign		
(1) infiltrativa	(2) expansiva	(9) ign	
(0) ausente	(1) presente	(9) ign	
(0) ausente	(1) presente	(9) ign	
(0) ausente	(1) presente	(9) ign	
(0) V0	(1) V1	(2) V2	
(0) L0	(1) L1	(2) L2	
(0) ausente	(1) presente	(9) ign	
(0) não operado	(1) livres	(2) comprometida	
(1) Adenocarcinoma tubular			
(3) Adenoca mucinoso (>50%)			
(5) CEC			
(7) Adenoescamoso			
(9) Pequenas células			
(11) Medular			
(0) não	(1) sim	(9) ign	
(0) não	(1) QT	(2) RxT	
(0) sem QT	(1) 5-FU/LV	(2) FOLFOX/FLOX	
(4) Bevacizumab	(8) outros	(9) ign	
(0) sem QT	(1) incompleta	(2) completa	
Primeira recidiva		S	N Ign
a. Pélvica.....		☐	☐
b. Parede abdominal.....		☐	☐
c. Peritônio.....		☐	☐
d. Anastomose.....		☐	☐
e. Linfonodo.....		☐	☐
f. Outra local.....		☐	☐
g. Fígado.....		☐	☐
h. Pulmão.....		☐	☐
g. Osso.....		☐	☐
h. Outro.....		☐	☐
Data			

Data da última informação _____ (1) VSED (2) VCED (3) VSOE (4) MOCA (5) MO s/ CA (6) MOSOE (7) Perdido de vista					
<i>AP da peça colorretal</i> _____ <i>AP outra peça</i> _____ <i>AP outros</i> _____					
Dados Moleculares					
Tecidos disponíveis (1) Sangue (2) Tumor (3) Normal colorretal (4) Adenoma (5) Normal outro (6) Outro tumor (9) ignorado					

Imunoistoquímica

(0) Não realizado (1) negativo (2) positivo (3) inconclusivo (9) ign

	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2	
Tumor					
Normal					
Adenoma					
Normal outro					
Outro Tumor					

Instabilidade de Microssatélites

(0) Não realizado (1) estável (2) instável (3) inconclusivo (9) ign

Tumor					
Normal					
Adenoma					
Normal outro					
Outro Tumor					